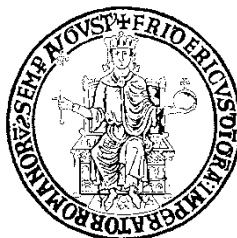


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA

Scuola di Dottorato in Scienze Biomorfologiche e Chirurgiche

Dottorato in Morfologia Clinica e Patologica XXVI ciclo

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

Tesi di Dottorato di Ricerca

**RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI MMP-9, MMP-7, MMP-2 E DEI LORO
INIBITORI TISSUTALI TIMP-1 E TIMP-2 NELLA PATOGENESI DELLA
POLIPOSIS NASALE**

Relatore:

Prof. Germano Guerra

Candidato:

Dott.ssa Anna Russo

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

Capitolo 1: La Poliposi nasale	pag. 2
Capitolo 2: Le Metalloproteasi	pag.16
• <i>2.1 Metalloproteasi 2 (MMP-2)</i>	
• <i>2.2 Metalloproteasi 7 (MMP-7)</i>	
• <i>2.3 Metalloproteasi 9 (MMP-9)</i>	
• <i>2.4 Inibitori delle Metalloproteasi (TIMPs)</i>	
Capitolo 3: Scopo delle ricerca	pag. 29
Capitolo 4: Materiale e Metodi	pag. 31
• <i>4.1 Campioni</i>	
• <i>4.2 Immunoistochimica</i>	
• <i>4.3 Western Blot</i>	
• <i>4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	
• <i>4.5 Analisi Statistica</i>	
Capitolo 5: Risultati	pag. 42
• <i>5.1 Rinofibroscopia</i>	
• <i>5.2 Immunoistochimica</i>	
• <i>5.3 Western Blot</i>	
• <i>5.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	
Capitolo 6: Discussione	pag. 57
Capitolo 7: Conclusioni	pag. 60
Bibliografia	

Capitolo 1

LA POLIPOSIS NASALE

La poliposi nasale, è un processo flogistico cronico a carico della mucosa di cavità nasali e seni paranasali, di frequente riscontro nella pratica otorinolaringoiatrica. Numerosi studi sono stati condotti allo scopo di individuare l'eziopatogenesi di tale malattia, anche se allo stato attuale persistono molte ipotesi tra loro spesso discordanti. Tali "incertezze" causali sono anche legate alla inefficacia nell'adozione di diversi provvedimenti terapeutici e talora riscontrabile l'alta incidenza di recidive.

La poliposi nasale oltre a rappresentare una problematica clinica, costituisce un importante problema sociale sia per la sua alta incidenza di riscontro (2-5% della popolazione mondiale), sia per le ripercussioni economiche che può indurre.

La spesa sanitaria è infatti influenzata da tale patologia sia per la riduzione della qualità di vita che comporta, che per la conseguente alterazione della performance lavorativa, e per l'impiego di farmaci talora a terapia combinata.

La poliposi nasale può essere considerata come il risultato della degenerazione edematosa multifocale della mucosa, come "risposta" di tipo flogistico ad "insulti eziologici" non ancora ben definiti.¹

Nella maggior parte dei casi si manifesta come primitiva e si può riscontrare sia in modo isolato che nel contesto di altre patologie come ad esempio avviene nelle associazioni "poliposi nasale-asma", "poliposi nasale-asma-intolleranza all'aspirina" *Triade di Fernand Vidal*.

Meno frequentemente la poliposi nasale si associa ad un interessamento specifico della mucosa respiratoria, come per esempio:

- nella *Fibrosi Cistica*, patologia delle ghiandole esocrine della mucosa nasale,

nella quale la patologia rinosinusale passa spesso in secondo piano dopo la patologia polmonare e digestiva; la percentuale di casi di mucoviscidosi con poliposi naso sinusale è circa il 3% e si manifesta spesso sin dalla prima infanzia;

- nella *Sindrome di Young*, patologia del muco nella quale si riscontrano poliposi nasale e azoospermia;
- nella patologia ciliare, come la *Sindrome di Kartagener* e la *Sindrome di Mounier-Kuhn*, ovvero patologie da discinesia ciliare primitiva nelle quali la poliposi nasale rappresenta parte integrante.
- Le formazioni polipoidi possono essere singole, ma più spesso si riscontrano multiple e bilaterali, e in base all'estensione della malattia si possono distinguere differenti forme di malattia: isolate, diffuse e massive.

La poliposi nasale in quanto patologia cronica, presenta una sintomatologia persistente, e la gravità clinica è correlabile con l'ampiezza delle masse polipoidi, determinando quadri clinici molto variabili da paziente a paziente.

La sintomatologia prevalente nei pazienti affetti da tale patologia è legata alla presenza di un'ostruzione nasale, condizione che induce una insufficienza respiratoria con riduzione del passaggio di aria inspirata, ed eventuali possibili differenze respiratorie tra i due lati.

La dispnea nasale tende a peggiorare nel tempo e viene lamentata dal paziente come sensazione di naso chiuso persistente a carattere non periodico o talora a carattere stagionale.

Un sintomo che può spesso ricorrere nella poliposi nasale è l'ipo-anosmia, diminuzione o scomparsa del senso dell'olfatto, legato alla difficoltà che l'aria inspirata incontra per raggiungere la mucosa olfattiva; tale sintomo, riveste un

ruolo molto importante nel contesto della patologia nasale, poiché compromette pesantemente la qualità di vita del paziente, anche se in alcuni casi viene riferito come poco rilevante per via dell'adattamento ad una condizione che si è instaurata gradualmente.

La presenza di tessuto polipoide, nel suo percorso di estensione locale determina l'ostruzione dell'ostio di drenaggio dei seni paranasali, meccanismo che ha come conseguenza un ristagno delle secrezioni, creando quindi un ambiente suscettibile all'instaurarsi di sovrainfezioni batteriche; i segni e sintomi che conseguono a questo quadro patologico sono quelli della flogosi rinosinusale, spesso a carattere recidivante.

In tali casi si possono aggiungere sintomi quali: sensazione di pressione in corrispondenza dei seni interessati, cefalea frontale e algie facciali. Altro sintomo spesso riferito è la rinorrea, in genere "acquosa", che si può eventualmente associare anche a scolo retrofaringeo, spesso muco- purulento. Nei casi massivi si possono anche manifestare rinolalia chiusa, respirazione orale obbligata, disfunzioni tubariche con ripercussioni sull'orecchio medio.

In periodi successivi possono anche comparire sintomi legati al coinvolgimento delle strutture anatomiche adiacenti, come irritazione faringea, laringea e tracheale, disfonia, tosse.¹

Talvolta si può riscontrare anche un coinvolgimento delle vie aeree inferiori, con presenza di broncospasmo, fino all'instaurazione di una vera e propria condizione di asma bronchiale.

In alcuni pazienti sono molto rilevanti anche sintomi sistemici quali malessere, sonnolenza, ansietà.

La diagnosi di poliposi nasale si fonda su alcuni elementi procedurali ben

precisi:

§ **Indagine Anamnestica**: indagando sulle caratteristiche della sintomatologia, sulla stagionalità, sulla eventuale familiarità per poliposi nasale, sulle patologie locali e sistemiche e sulla terapia farmacologica effettuata dal paziente;

§ **Rinoscopia Anteriore**: metodica attraverso la quale è possibile essere osservare i polipi, che nelle forme iniziali sono individuabili a livello del meato medio o superiore, associati eventualmente alla presenza di edema e secrezioni, mentre nelle forme molto avanzate possono talvolta occupare tutta la cavità nasale. Macroscopicamente alla visione rinoscopica, si presentano come vegetazioni lisce, traslucide e di colore biancastro, di consistenza molle in fasi iniziali e meno nelle fasi avanzate; la rinoscopia anteriore può essere di valido ausilio nel mettere in luce eventuali anomalie anatomiche quali la conca bulbosa, la concavità invertita del turbinato medio, la deviazione del setto nasale.

§ **Esame Rinofibroscopico**: che attraverso l'utilizzo di un endoscopio a fibre ottiche flessibile o rigido, consente di effettuare una osservazione diretta delle masse patologiche endonasali e la loro caratterizzazione macroscopica, anche se non consente di visualizzare la reale base di impianto dei polipi, nè di valutare l'effettiva estensione della malattia.

L'iter diagnostico viene completato con la TC del massiccio facciale, senza mezzo di contrasto, che attraverso proiezioni assiali e coronali consente sia di studiare la reale estensione locale del problema, ma anche di identificare eventuali varianti anatomiche delle strutture ossee e valutare gli usuali punti di repere chirurgici.

La poliposi nasale, già descritta da Ippocrate nel 3000 a.C., è ancora oggi oggetto di studio in quanto poco è stato scoperto sulle cause della malattia; è

noto però che il polipo nasale non rappresenta la malattia, bensì il “sintomo” più evidente di essa.

Negli ultimi due decenni gli studi relativi alla poliposi nasale si sono notevolmente incrementati; in particolare sono state poste in rilievo le possibili correlazioni con le manifestazioni atopiche, anche se a causa dei risultati poco coerenti e spesso contrastanti, tale associazione rimane dubbia.

Alla luce delle attuali conoscenze la poliposi nasale è considerata come una malattia multifattoriale, nella quale fattori allergici, infettivi, infiammatori, anatomici, e genetici, sembrano possano essere variamente coinvolti nell'insorgenza di un processo flogistico cronico della mucosa nasale e dei seni paranasali.¹

I polipi nasosinusalali non sono masse di tessuto neoformato, bensì estroflessioni focali della mucosa che si accrescono progressivamente in cavità nasale; all'inizio si presentano come piccoli, circoscritti e non oltrepassano il bordo del turbinato medio, ma nel tempo aumentano di numero e dimensioni, raggiungono il margine superiore del turbinato inferiore fino ad occludere le cavità nasali, costituendo un ostacolo al passaggio dell'aria e ostruendo il passaggio sinusale (Figura 1). Sono state proposte numerose teorie relative al meccanismo di formazione dei polipi nasali, ma spesso sono risultate in notevole contrasto tra di loro.

Secondo alcuni autori, i polipi sarebbero l'espressione clinica di una flogosi locale persistente, che ha come conseguenza la degenerazione edematosa della mucosa dei seni paranasali: episodi ricorrenti di rinosinusite allergica, ad esempio, determinano un'alterazione della permeabilità vascolare con formazione di un edema trasudatizio nel corion mucoso, che nei periodi

intercritici, non viene riassorbito completamente, con conseguente accumulo e scollamento della mucosa sinusale.

La mucosa edematosa, per l'impossibilità ad accrescersi all'interno del seno, che ha pareti inestensibili, per la forza di gravità e per la presenza di una pressione negativa inspiratoria endonasale, va incontro ad erniazione attraverso l'ostio di drenaggio sinusale, formando dei "polipi" che protrudono in cavità nasale e che tendono ad ingrandirsi con il ripetersi delle crisi.

Alcune osservazioni microscopiche farebbero invece propendere per un meccanismo diverso, basato su una primitiva rottura epiteliale della mucosa nasale, soprattutto in corrispondenza delle zone maggiormente esposte al flusso aereo, attraverso le quali si verificherebbe il prollasso della lamina propria.

Tale lesione verrebbe riparata con uno strato epiteliale neoformato che per questo risulta diverso dalla mucosa circostante, con cellule cilindriche marcatamente ipertrofiche, e foci di metaplasia squamosa, e con ghiandole tubulari.

La poliposi naso sinusale è una malattia multifocale, ma il suo punto di partenza, nella maggior parte dei casi, è a livello dell'etmoide (soprattutto anteriore), fattore in genere riconducibile a due motivi: la mucosa è sottile e facilmente scollabile, a causa della presenza dell'edema che riempie rapidamente le piccole celle e ostruisce i fini ostii, determinando così un circolo vizioso (edema, occlusione e quindi peggioramento dell'edema); l'etmoide, presenta una posizione chiave nel meccanismo di drenaggio dell'intero sistema sinusale, permettendo l'estensione della lesione agli altri seni per ostruzione ostiale. I fenomeni aerodinamici causati dalle correnti aeree all'interno delle fosse nasali e dei meati hanno un ruolo aggravante come dimostra la maggiore presenza di

polipi attorno al turbinato medio e dal lato della concavità settale, quando esistono, zone in cui la pressione negativa è massima durante l'inspirazione. Sedi altrettanto frequenti di provenienza dei polipi sono i seni mascellari, mentre meno frequentemente i polipi nascono dalle cellule etmoidali posteriori e ancora più raramente dai seni sfenoidali da dove penetrano portandosi nel meato superiore.

Non c'è totale accordo circa l'origine dai seni paranasali, alcuni autori ritengono infatti che i polipi non derivino dalla mucosa sinusale, ma nascono direttamente dalla mucosa nasale, per lo più dalla regione del meato medio, a livello della parete laterale e in prossimità degli osti sinusali, senza però che le cellule etmoidali siano occupate.

Sicuramente un ruolo fondamentale è svolto dalla mucosa del meato medio, particolarmente esposta ad insulti infiammatori a partenza dal seno mascellare e dalle cellule etmoidali.

Dal punto di vista istologico si distinguono vari tipi di polipi:

- Edematoso (85-90%)
- Fibro-infiammatorio
- Iperplastico

I polipi strutturalmente hanno aspetto pseudocistico e sono formati da uno stroma connettivale edematoso lasso, a volte francamente fibrotico, e da un rivestimento mucoso di cellule epiteliali secernenti iperplastiche su una membrana basale ispessita, in presenza di un infiltrato infiammatorio con predominanza di eosinofili. La componente ghiandolare è in genere diminuita e irregolarmente distribuita.

Spesso nella parte anteriore del polipo, più sottoposta al flusso aereo, la mucosa

può essere danneggiata o ulcerata, e vi si possono repertare aree di metaplasia squamosa da riparazione. Nei polipi più grandi, le cellule sono distese, con spazi cellulari dilatati (aspetto a selciato); la proliferazione delle cellule epiteliali dei polipi e della mucosa edematosa dei seni è sotto il controllo di vari fattori di crescita, soprattutto IGF118.

Nel contesto del polipo si trova un infiltrato notevolmente polimorfo di cellule infiammatorie, soprattutto eosinofili ma spesso si riscontrano anche linfociti e mastociti.

Nella fase iniziale l'infiltrato è in sede sottoepiteliale, e successivamente con l'accrescersi del polipo si distribuisce a tutta la mucosa sia locale che circostante. La ricchezza in eosinofili è segno di una patologia infiammatoria cronica.

Nella poliposi nasale associata alla fibrosi cistica e alle discinesie ciliari, l'infiltrato infiammatorio è costituito prevalentemente da neutrofili, mentre nelle forme associate alla triade di Widal prevalgono gli eosinofili.

La classificazione "*polipi neutrofilici*" e "*polipi eosinofilici*" è molto schematica e non è sufficiente a descrivere la malattia e ad identificare i suoi meccanismi. L'infiammazione cronica della mucosa nasosinusale è un fattore comune riscontrato in tutte le poliposi nasali, come dimostra la ricchezza di popolazioni cellulari infiammatorie riscontrata nei polipi e nella mucosa circostante.

La causa e il determinismo patogenetico di questa infiammazione cronica non sono del tutto definiti. Probabilmente sono molti i fattori implicati, differendo a seconda del tipo di poliposi nasale (poliposi nasale primitiva e poliposi nasale nella S.di Kartagener e nella mucoviscidosi), in quanto il polipo non è altro che espressione clinica di malattie infiammatorie croniche differenti.

L'infezione locale, a lungo considerata come fattore primario, sembra invece essere nella maggior parte dei casi secondaria all'ostruzione e alla ritenzione sinusale.

Il ruolo dell'allergia nella poliposi nasale è molto controverso.

Tale patologia per molti anni è stata considerata all'origine della poliposi nasale primitiva, sia per analogia sintomatica tra rinite allergica e poliposi nasale sia per l'associazione frequente poliposi naso sinusale-asma-eosinofilia; molti studi hanno invece dimostrato il contrario, evidenziando che l'allergia IgE mediata non è maggiormente frequente nei soggetti colpiti da poliposi nasale rispetto alla popolazione generale e nei casi in cui l'allergia è effettivamente associata alla poliposi nasale, essa rappresenta un fattore prognostico negativo e predispone ad una maggiore probabilità di recidive.

Tale tipo di correlazione non è comunque completamente chiarita.

La *NARES (non-allergic rhinitis with eosinophile syndrome)* è stata descritta nel 1980 da Jacobs e Mullarkey.

Benché i sintomi siano simili a quelli della rinite allergica, la valutazione allergologica è costantemente negativa, mentre di frequente riscontro è una condizione di ipereosinofilia.

Tale elevato numero di eosinofili, presente anche nell'80% di poliposi nasale, e il frequente riscontro di polipi all'endoscopia o TC di pazienti affetti da NARES, hanno fatto ipotizzare ad una possibile stretta correlazione evolutiva tra NARES (ipereosinofilia secretoria) e poliposi naso sinusale (ipereosinofilia tissutale).

Il meccanismo patogenetico di tale associazione sembra legato ad una disautonomia neurovegetativa (ipersimpaticotonia a livello della mucosa nasale), dalla quale risulterebbe una vasocostrizione topica con anossia tissutale,

fenomeno che favorirebbe la degranolazione dei mastociti locali, con liberazione dell'istamina. Oltre all'istamina i mastociti liberano l'ECF-A, fattore chemiotattico per gli eosinofili. Il risultato sarebbe un'inflammazione neurogena con il richiamo di eosinofili che liberano nuove sostanze tossiche.

La formazione di polipi nasali procede di pari passo con l'aumento della superficie dell'epitelio e quindi con un certo grado di proliferazione delle cellule epiteliali respiratorie.

I meccanismi artefici e regolatori di tale proliferazione potrebbero dipendere, almeno in parte, da uno o più fattori di crescita.

I fattori di crescita sono peptidi che possiedono origine ed azione di varia natura, e molti studi hanno messo in evidenza con tecnica immunoistochimica la presenza di concentrazioni elevate di "*Insulin like growth factor*" (IGF-I) all'interno dei polipi e della mucosa edematosa dei seni di pazienti portatori di poliposi nasale, mentre nei soggetti sani sono state riscontrate basse concentrazioni, così come sui prelievi effettuati a livello dei turbinati inferiori dei soggetti con poliposi nasale.¹

Secondo alcune teorie eziopatogenetiche, a seguito di una reazione infiammatoria in cui la maggior parte delle popolazioni cellulari esprime un'attività in IGF-I, si avrebbe un accumulo di tale fattore di crescita.

Le condizioni anatomiche sinusali e in particolari quelle etmoidali favorirebbero l'aumento della concentrazione di IGF-I che sarebbe responsabile di una proliferazione cellulare anormale con ipertrofia tissutale.

In tutte le poliposi nasali è costantemente presente un'infiltrazione cellulare infiammatoria molto ricca all'interno dei polipi e della mucosa limitrofa.

Studi sono stati effettuati circa il ruolo dei *mastociti* che tuttora rimane

controverso; alcuni autori li descrivono in notevole aumento nei pazienti con triade di Fernand-Widal (poliposi nasale, asma, intolleranza all'aspirina).

Il ruolo dell'infiltrazione eosinofila sembra invece essere la caratteristica istologica della poliposi nasale primitiva.

Gli *eosinofili* avrebbero infatti un ruolo fondamentale nella cronicizzazione della reazione infiammatoria per la loro ricchezza di recettori di membrana e di mediatori attivi.

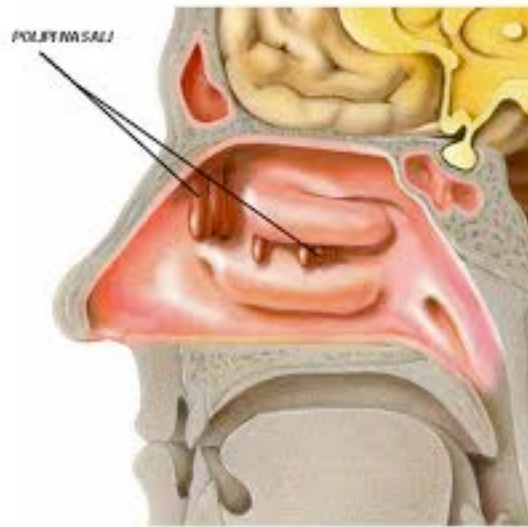
I *linfociti* sono cellule fondamentali nella risposta immunitaria assicurandone lo sviluppo e la regolazione.

Il ruolo dei linfociti non è stato molto studiato nel contesto della poliposi nasale anche se alcuni autori hanno rilevato la presenza di numerosi linfociti all'interno dei polipi e della mucosa circostante in pazienti con poliposi nasale.

Ricerche condotte allo scopo di verificare tale ipotesi, hanno rilevato in alcuni casi una predominanza di linfociti soppressori citotossici CD8⁺ rispetto ai linfociti T Helper CD4⁺, con diminuzione del rapporto CD4⁺/CD8⁺ nei polipi e nella mucosa del meato medio.

L'infiltrazione da parte dei *neutrofili* è particolarmente importante nella poliposi nasale nei pazienti affetti da mucoviscidosi e da discinesie ciliari. Questa concentrazione cellulare probabilmente è dovuta all'importanza e alla quasi costanza di infezioni all'interno della mucosa respiratoria in queste patologie. Secondo studi recenti, nella patogenesi della poliposi nasale giocherebbe un ruolo importante la proteina *HMGB1* (*High Mobility Group Box-1*)²⁴.

Essa stimolerebbe la produzione di citochine²⁵ (*IL1, IL2, IL4, IL5, IL8, TNF*) che sarebbero responsabili della flogosi e dell'edema dei tessuti.¹



(A)



(B)

Figura 1: (A) Principali sedi di insorgenza di polipi nasali; (B) Immagine endoscopica di un polipo nasale

Capitolo 2

LE METALLOPROTEASI

Le metalloproteasi (MMP) sono una famiglia di enzimi, prevalentemente prodotti da cellule del tessuto connettivo e secreti nella matrice extracellulare (ECM). Si tratta di endopeptidasi zinco-dipendenti in grado di degradare gran parte dell'ECM, infatti le MMP sono coinvolte nei normali processi fisiologici che coinvolgono il rimodellamento del tessuto e sono alla base di alcune patologie.

Il rimodellamento dell' ECM è parte integrante della crescita e del differenziamento di un tessuto, esse vengono espresse mediante regolazione trascrizionale controllata da mediatori infiammatori (citochine e fattori di crescita), possiamo quindi comprendere il legame fra MMP e processi infiammatori.

Allo stato attuale della ricerca ne sono note almeno 28 differenti tipi, suddivise in subfamiglie che possiamo dividere in cinque classi principali: gelatinasi (MMP-2, MMP-9), collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-12), matrilisina (MMP-7), metalloproteasi di membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP), pur mantenendo un'elevata omologia, si distinguono in base alla efficienza di proteolisi dei componenti della matrice (Figura 2).

Una tipica metalloproteasi è costituita da un prodominio di circa 80 aminoacidi, un sito catalitico di circa 170 residui aminoacidici, un peptide linker di lunghezza variabile (detto hinge region) ed un dominio hemopexin-like di circa 200 aminoacidi. La proteina una volta sintetizzata viene secreta nella sua forma inattiva (pro-MMP), nella quale l'atomo di zinco, presente nel sito catalitico, non è disponibile alla formazione di legami a causa della presenza di una cisteina. L'attivazione è successiva e deriva dall'esposizione del sito catalitico, che può, a questo punto, interagire con i substrati.

Questa attivazione può essere di due tipi: enzimatica o non enzimatica. Nel primo caso avviene per azione di enzimi proteolitici, fra i quali plasmina o altre MMP.²

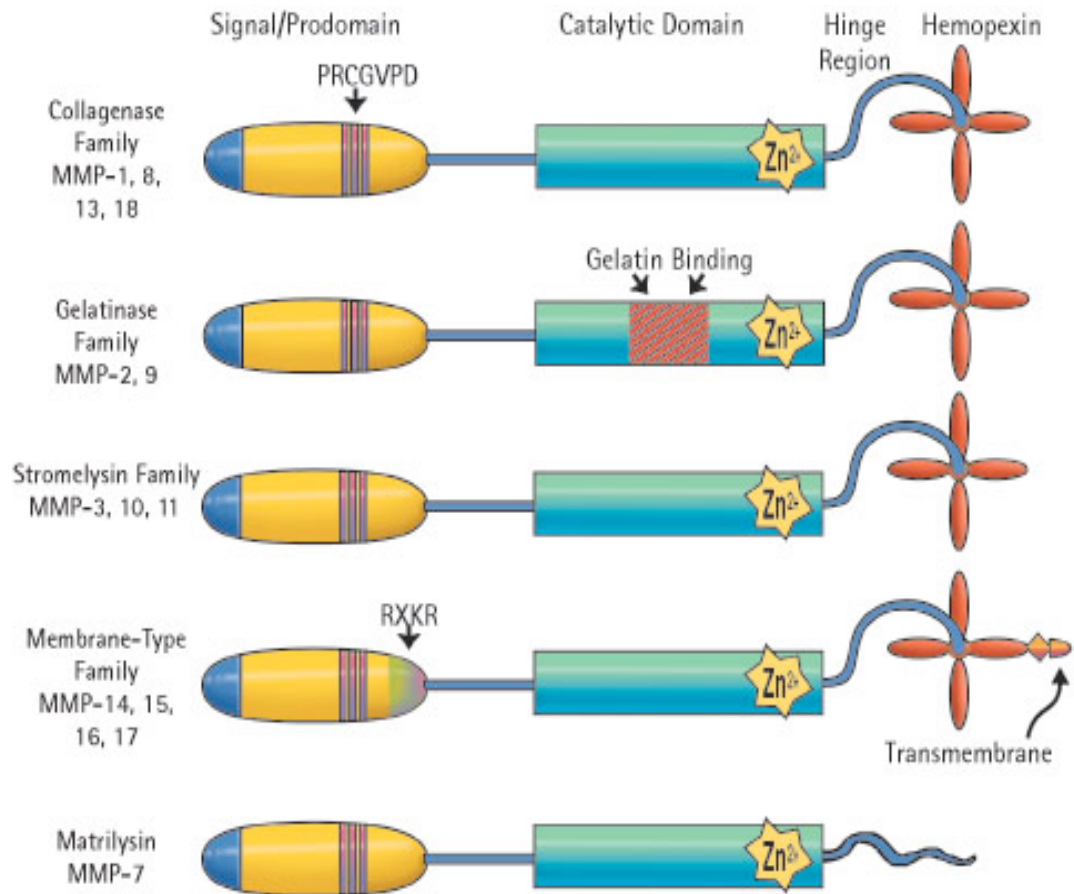


Figura 2: Le 5 classi principali di Metalloproteasi

2.1 METALLOPROTEASI 2 (MMP-2)

Le MMP-2 insieme alle MMP-9 appartengono alla categoria delle *gelatinasi*, che hanno attività collageno-litica, degradano fibronectina, laminina e gelatina; sono inoltre responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP.

La loro attivazione avviene nello spazio extracellulare a livello della membrana e richiede l'assistenza di TIMP- 2 e di due molecole di MMP-14, molecola transmembranaria.

Nel processo di attivazione, una MMP-14 si lega al TIMP-2: tale complesso prende contatto con la proMMP-2 e, tramite una seconda MMP-14, vi è la scissione della cisteina e la conseguente attivazione della MMP-2. E' necessario che tale processo avvenga in presenza di un gran numero di MMP-14 e che la concentrazione di TIMP-2 sia bassa; diversamente, tale inibitore bloccherebbe l'azione della seconda MMP-14.

Le MMP-2 sono composte da una catena singola proteica che si piega in quattro domini separati.

Il dominio catalitico, con atomi di carbonio bianco, esegue la reazione di scissione. Nell'enzima attivo, lo ione zinco può solo essere visto in profondità all'interno della fessura del sito attivo al centro del dominio, di colore verde ed evidenziato con una freccia (Figura 3a).

Nell'enzima inattivo, il dominio del propeptide, con gli atomi di carbonio colorati in verde, copre il sito attivo e blocca l'accesso allo ione zinco (Figura 3b).

Le MMP-2 risultano essere fondamentali, come sopra citato, nel rimodellamento tissutale.

L'ECM è la componente acellulare dei tessuti connettivi ed è costituita da una component fibrillare (collagene, fibronectina, elastina, fibrinina, laminina) e da una componente amorfa contenente proteoglicani e glicoproteine non strutturali. Il ruolo

delle MMP-2 è quello di scindere il collagene il cui compito è quello di creare spazi o domini specifici nell'ECM atti a selezionare il passaggio di sostanze.

Per quanto concerne i TIMP, essi sono enzimi endogeni inibitori delle MMP; presentano conformazione a cuneo e si legano al sito attivo dell'enzima che inibiscono, occupandolo e impedendo i legami con substrati. Nel caso delle TIMP-2 sono riconosciute altre importanti funzioni biologiche, quali l'inibizione della crescita tumorale e attività antiapoptotiche.

Un non corretto equilibrio nella gestione delle MMP a carico dei TIMP o causato da disfunzioni trascrizionali/traduzionali può indurre stati patologici.

Le MMP-2 sono coinvolte nella genesi e nella caratterizzazione degli aneurismi aterosclerotici dell'aorta addominale.

Difatti, in pazienti che presentano tale diagnosi, si riscontrano livelli di MMP sierici molto elevati. La causa è da ricercarsi nella mancata inibizione delle MMP da parte dei TIMP, ciò conduce inevitabilmente al disturbo sopracitato, poiché gli MMP si rendono autori della degradazione di elastina e collagene presente all'interno dei vasi.

In particolare, le MMP-2 sono altresì coinvolte nella rottura di placche aterosclerotiche, in quanto presenti nelle stesse, in diagnosi di ACS (Sindrome Coronarica Acuta). Alla rottura delle placche può seguire trombosi di vasi e/o capillari periferici.

Nella patologia del morbo di Alzheimer, associata all'accumulo di placche amiloidi, le MMP2 sono in grado di degradare tali placche posticipando l'effetto tossico per le cellule endoteliali; allo stesso tempo però le MMP2 essendo in grado anche di agire sui componenti della membrana basale possono compromettere l'integrità della barriera ematoencefalica e quindi incrementare notevolmente il rischio di emorragie cerebrali.

I pazienti affetti da demenza sottocorticale vascolare ischemica (SIVD) presentano un incremento delle MMP-2 nel fluido cerebrospinale associate all'incremento di albumine

e ciò suggerisce che le MMP potrebbero contribuire alla patofisiologia di SIVD.

Per quel che riguarda le lesioni, quelle croniche, a differenza delle lesioni acute, presentano livelli elevati, anomali, di matrice di MMP. Un normale processo di guarigione viene pregiudicato da questo squilibrio: una strategia per curare le lesioni croniche consiste nel portare il livello di MMP-2 e MMP-9 a valori simili a quelli che si trovano in un normale processo di guarigione: ciò è fattibile utilizzando una medicazione al collagene.

La matrice delle metalloproteasi, soprattutto delle MMP-2 e MMP-9, svolge un ruolo cruciale nell'invasione tumorale e nel relativo sviluppo di metastasi.

Elevati valori di MMP-2 e MMP-9 si manifestano generalmente in cancro invasivo ed altamente cancerogeno, come i tumori del colon-retto, carcinoma gastrico, carcinoma del pancreas, cancro al seno, cancro orale, melanoma, gliomi maligni, condrosarcoma, adenocarcinoma gastrointestinale. I livelli risultano incrementati anche in astrocytoma maligno, meningite carcinomatosa e metastasi cerebrali.

Le MMP promuovono la progressione del tumore e delle metastasi e la degradazione della ECM che consiste di due componenti principali: le membrane basali e interstiziale del tessuto connettivo. Anche se ECM comprende molte proteine, l'elemento principale è il collagene IV, efficientemente degradato da MMP-2 e MMP-9, che in tal modo consentono alle cellule tumorali metastatiche di passare attraverso la membrana basale. La degradazione di ECM non aiuta solo la migrazione di cellule tumorali metastatiche, ma permette anche la crescita del tumore, fornendo lo spazio necessario. Inoltre, è da notare che il rapporto tra forma attiva e latent di MMP-2 aumenta con la progressione del tumore nei cancro invasivi. MMP-2, con i suoi familiari, promuove l'angiogenesi, un processo critico necessario per la sopravvivenza delle cellule tumorali.²

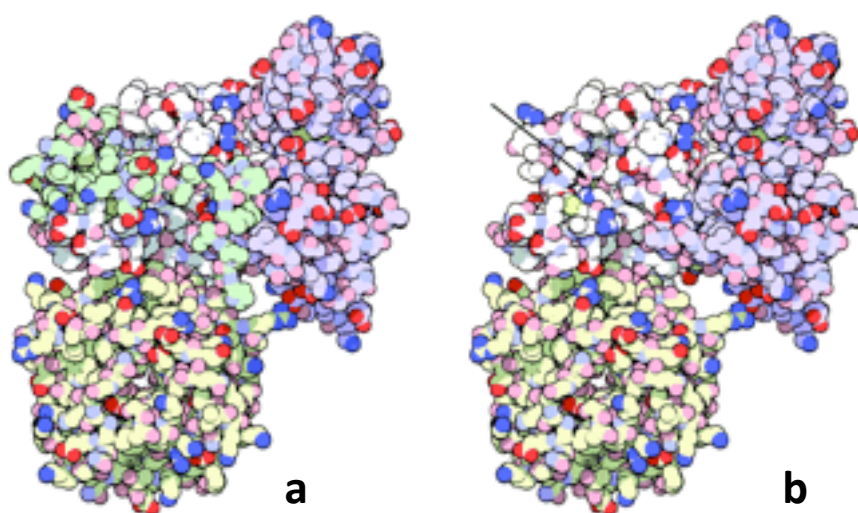


Figura 3: Forma inattiva (a) ed attiva (b) della MMP-2

2.2 METALLOPROTEASI 7 (MMP-7)

La MMP-7 è la più piccola metalloproteasi nota (circa 28 KD), appartiene alle stromalisine, nello specifico al gruppo delle matrilisine.

Presenta vari substrati che includono collagene IV e X, gelatina, fibronectina, laminina, elastina, vitronectina, α -1 antitripsina, angiostatina e precursore TNF.

Gli attivatori della MMP-7 sono la MMP-3 e la plasmina, mentre a sua volta ha il ruolo di attivatore della MMP-2.

Di regola le metalloproteasi sono inattive in virtù dell'azione del TIMP (Inibitore Tissutale delle Metalloproteasi). Tuttavia in casi patologici questo sistema è inibito e la metalloproteasi continua la sua azione di degradazione della matrice favorendo il passaggio delle cellule tumorali che attecchiscono al substrato.

La matrilisina (MMP-7) è espressa in cellule epiteliali ghiandolari e in determinati tessuti tumorali.

Le sue proprietà sono di degradare proteoglicani, collagene di tipo IV, laminina, fibronectina, elastina, decorina, tenascina, i domini globulari di collagene I e III e la subunità dell'integrina β 4. Inoltre in quanto appartenente alle stromalisine, è in grado di attivare la procollagenasi e processare il pro-TNF- α ; regola la formazione di vasi sanguigni attraverso il taglio del plasminogeno e conseguente generazione di molecole di angiostatina.

Si ritiene inoltre che abbia una qualche responsabilità nella degradazione della matrice extracellulare (ECM), nei processi dell'osteoartrite.

Nel 2010 presso il Department of Surgery, Rajavithi Hospital, Bangkok, Thailand è stato condotto uno studio per determinare se i livelli sierici di matrice metalloproteasi-7 siano indicatori per la diagnosi di colangiocarcinoma da malattie benigne delle vie

biliari. I livelli sierici di MMP7 e di siero antigene carboidrato 19-9 (CA19-9) sono stati analizzati e confrontati in 187 pazienti con ittero ostruttivo.

I livelli sierici di CA19-9 e MMP7 sono risultati significativamente elevati nei pazienti affetti da colangiocarcinoma.

Nell'analisi della cura per la diagnosi di tale patologia, le MMP7 sono risultate più precise di CA19-9. La sensibilità e la specificità del siero MMP7 (valore soglia di 5,5 ng/mL) è stata del 75% e 78% rispettivamente, mentre per quanto riguarda il siero CA19-9 (valore soglia di 100 U/mL) era di 68% e 87% rispettivamente.

Questi risultati sono stati avvalorati da un altro studio, condotto nel marzo 2011 presso l'Università di Hebei, in Cina, che aveva lo scopo di soppesare la possibilità di utilizzare come biomarker un siero con autoanticorpi contro MMP7 in pazienti con carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC).

La ricerca, condotta su pazienti con ESCC e con un cancro gastrico, ha dimostrato che, sebbene i livelli di autoanticorpi contro MMP7 siano stati significativamente più elevati nei pazienti affetti da cancro gastrico, l'accuratezza diagnostica è stata meno significativa rispetto ai pazienti con ESCC.²

2.3 METALLOPROTEASI 9 (MMP-9)

Le MMP-9, facenti parte della classe delle gelatinasi, hanno come funzione primaria quella di degradare le proteine della matrice extracellulare per permetterne il rinnovo (turn-over), necessario a seguito dell'invecchiamento dei vari componenti, svolgendo così un fondamentale ruolo strutturale.

Normalmente questi enzimi (così come tutte le metalloproteasi) sono già presenti nella matrice ma in forma inattiva in quanto legate ad una sostanza: TIMP (inibitore delle metalloproteasi). E' quando questo fattore si stacca che le MMP entrano in azione passando dallo stato inattivo a quello attivo.

Questo meccanismo è di un'importanza cruciale, dal momento che permette di avere un pool di enzimi già pronti all'uso che devono solo essere attivati e che non devono quindi essere sintetizzati ex-novo ogni volta che sono necessari.

Ogni alterazione del suo equilibrio può avere conseguenze a livello tissutale e sistemico. A questo punto le MMP attivate possono digerire proteoliticamente decorina, elastina, fibrillina, laminina, la gelatina (collagene denaturato) e collagene di tipo IV, V, XI e XVI e ,infine, attivare specifici fattori di crescita.

Terminato il proprio lavoro le MMP tornano a legarsi ai TIMP e stazionano nuovamente in uno stato di inattività, cosa che non avviene nelle cellule tumorali.

Purtroppo, non sono ancora disponibili i dati cristallografici della MMP-9; tuttavia, utilizzando opportuni programmi di calcolo, è stato possibile ottenere una loro plausibile struttura, sfruttando l'omologia con altre proteine note, come ad esempio le MMP-2 (Figura 4).

Fisiologicamente, le MMP-9, coordinandosi con le altre MMP, svolgono un ruolo importante nel rimodellamento del tessuto durante lo sviluppo embrionale, nell'angiogenesi, nell'ovulazione, nell'involuzione della ghiandola mammaria e nella

guarigione delle ferite. Le MMP-9 con altre MMP si occupano anche di formazione ossea e inibiscono il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti. Inoltre, sono implicate nella formazione di metastasi dal momento che la cellula tumorale sfrutta la loro azione per rimuovere i siti di adesione delle cellule alla matrice e alla membrana basale e per scavare un tunnel. Quest'ultimo permetterà loro di migrare e arrivare ai vasi, attraverso cui raggiungeranno i vari distretti. E' per questo che si registrano valori elevati delle MMP-9 nei tumori più invasivi: i tumori del colon-retto, il carcinoma gastrico, il carcinoma del pancreas, il cancro al seno, il cancro orale, il melanoma, l'adenocarcinoma gastrointestinale.

Utilizzando opportune tecniche è stato recentemente dimostrato che le MMP-9 sono presenti a livelli elevati nel siero e nel liquor di pazienti con Sclerosi Multipla (MS) e che tale aumento è correlato allo stadio clinico della malattia. Il prossimo obiettivo sarà quello di chiarire l'origine delle MMP-9 liquorali, poiché non è, a tutt'oggi, chiaro se possa esserci sintesi intratecale di MMP-9 oppure se queste possano derivare dal siero per passaggio attraverso la barriera emato-encefalica (BBB) danneggiata. Fino ad ora gli studi hanno, inoltre, evidenziato uno spostamento dell'equilibrio MMP-9/TIMP-1 a favore delle MMP-9 durante la fase acuta della malattia. Una molecola importante che inibisce significativamente la secrezione di MMP-9 da parte delle cellule neoplastiche è l'inositolo esafosfato (IP6). Inoltre il trattamento con IP6 causa anche una riduzione considerevole dell'adesione delle cellule cancerose alla matrice extracellulare. I risultati hanno mostrato che l'IP6 abbassa di circa il 70% sia il numero delle cellule migranti, sia la distanza percorsa da tale migrazione. Su questo e altri fattori, che interagiscono con l'attività delle metalloproteasi, è puntata l'attenzione dei ricercatori al fine di ripristinare il meccanismo di inibizione e arrestare lo sviluppo delle cellule tumorali.²

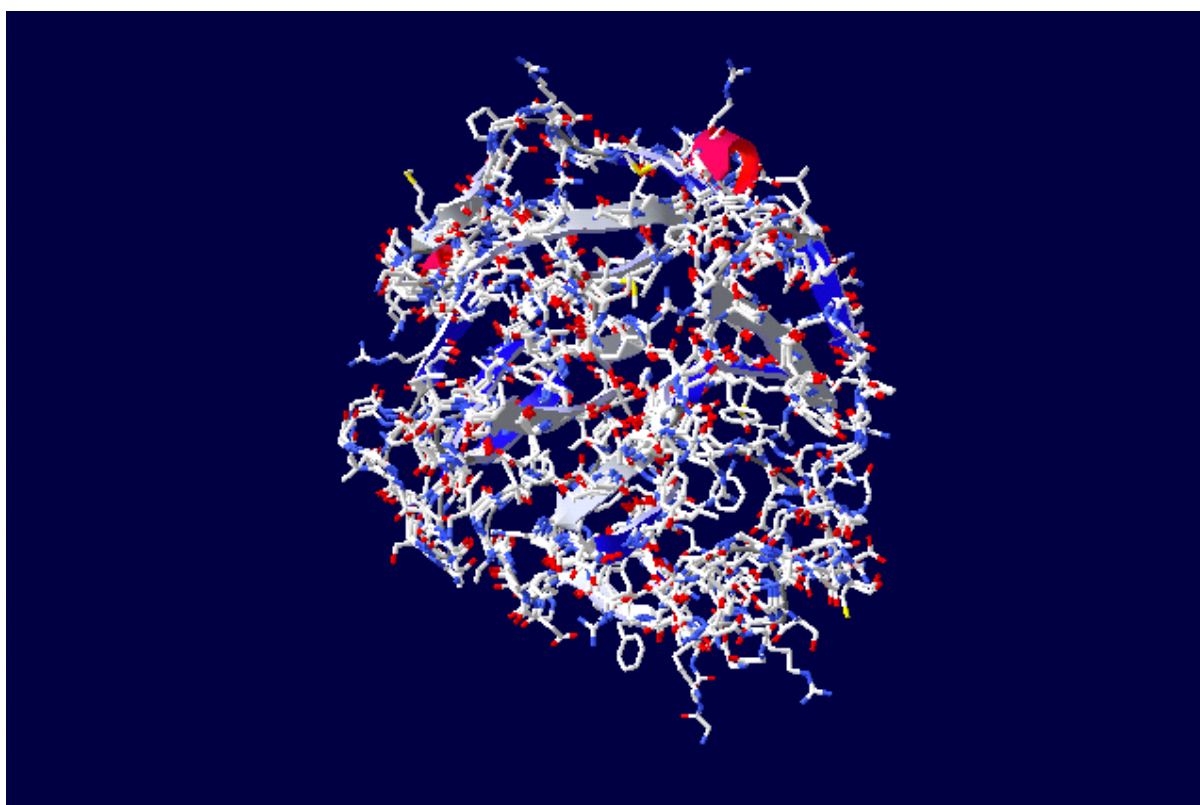


Figura 4: Struttura molecolare terziaria della MMP-9

2.4 INIBITORI DELLE METALLOPROTEASI (TIMPs)

Una volta che le MMPs vengono secrete nello spazio extracellulare ed attivate, un meccanismo di controllo molto importante sull'attività degradatoria di questi enzimi è l'inibizione.

Questa può avvenire tramite inibitori aspecifici, come la α 2-macroglobulina, ma più importante è invece l'interazione con gli inibitori specifici TIMPs (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase).

Le MMPs sono inibite da ***inibitori tissutali delle metalloproteinasi*** ("tissue inhibitor of metalloproteinases; (TIMPs)" specifici che comprendono una famiglia di quattro inibitori delle proteasi, TIMP-1 (Figura 5A), TIMP-2 (Figura 5B), TIMP-3 and TIMP-4. Complessivamente, tutte le MMP sono inibite dai TIMPs dopo attivazione ma le gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) possono formare complessi con TIMPs quando l'enzima è nella forma latente.

Il complesso della MMP-2 latente (pro-MMP-2) con TIMP-2 serve per facilitare l'attivazione del pro-MMP-2 sulla superficie cellulare da parte della MT1-MMP (MMP-14), una MMP ancorata alla membrana.

Il ruolo del complesso pro-MMP-9/TIMP-1 è ancora sconosciuto

Gli inibitori sintetici di solito contengono un gruppo chelante che si lega fortemente allo zinco catalitico nel sito attivo delle MMP.

I gruppi chelanti più comuni includono idrossamati, carbossilati, tioli e fosfinili.

Gli idrossamati sono inibitori particolarmente potenti delle MMPs e di altri enzimi zinco-dipendenti perchè hanno il potere di chelare doppiamente l'atomo di zinco.

Altri sostituti di questi inibitori vengono di solito concepiti per interagire con le varie tasche di legame della MMP in questione, rendendo l'inibitore più o meno specifico per

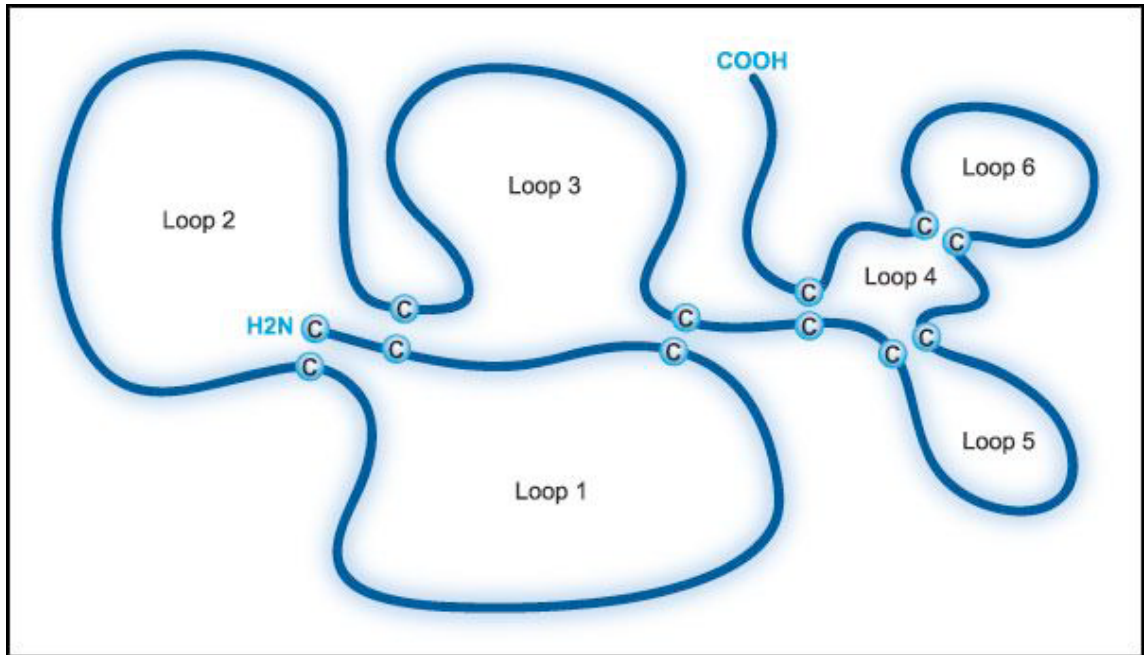
una data MMP.

Inoltre, gli TIMPs hanno dimostrato di avere:

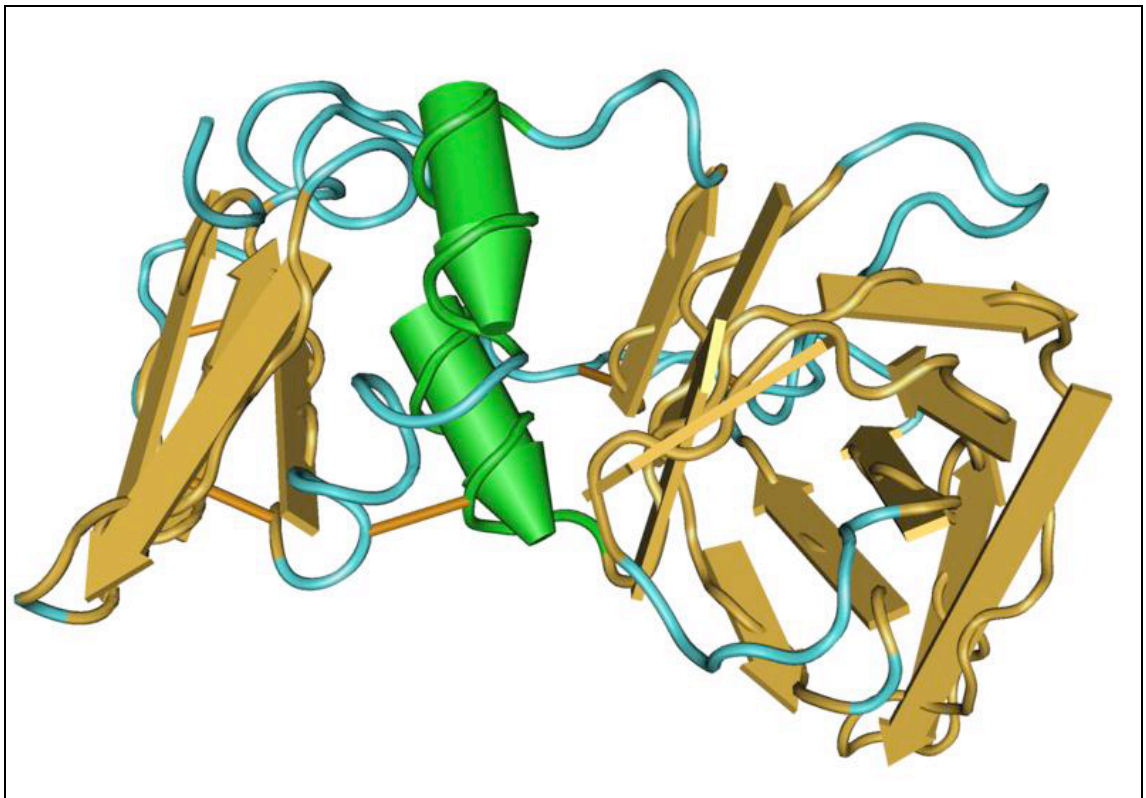
- *attività promotrici della crescita* che sono *indipendenti dalla loro capacità inibitoria delle MMPs*
- *proprietà induttrici dell'apoptosi* (TIMP3)

La *trascrizione* degli TIMPs è *regolata da citochine e da fattori di crescita* simili a quelli che controllano l'espressione delle MMPs (es. TGFb, TNFa, IL-1, IL-6) nonostante spesso lo facciano in modo diverso.

Altri inibitori endogeni includono la proteina plasmatica α 2-macroglobulina e un inibitore di superficie delle MMP, l'inibitore RECK.³



(A)



(B)

Figura 5: Struttura di TIMP-1 (A) e TIMP-2 (B)

Capitolo 3

SCOPO DELLA RICERCA

La *poliposi nasale* è patologia infiammatoria cronica multifattoriale caratterizzata da alterazioni a carico della mucosa naso-sinusale, quali infiltrazione cellulare, modificazioni della differenziazione delle cellule epiteliali e fenomeni di rimodellamento tissutale rappresentati da ispessimento della membrana basale, modificazioni dell'epitelio ghiandolare ed accumulo della matrice extracellulare (ECM-extracellular matrix)⁴⁻⁹.

Diversi studi istopatologici ed immunoistochimici, condotti su reperti autoptici, hanno permesso di analizzare importanti caratteristiche anatomiche della poliposi naso-sinusale: i polipi sembrerebbero essere maggiormente localizzati a livello del meato medio (ostio del labirinto etmoidale anteriore, ostio del seno mascellare, porzione mediale del meato medio, recesso sopra-retrobullare, processo uncinato e recesso frontale) meno frequentemente localizzati a livello del meato superiore (recesso sfenoetmoidale e ostio del labirinto etmoidale posteriore)¹⁰.

Le numerose ricerche biomorfologiche, molecolari e genetiche, non hanno ancora messo in luce i meccanismi a monte delle alterazioni tissutali connesse allo sviluppo della poliposi naso-sinusale che, dal punto di vista clinico, può assumere una espressione morfologica variabile da una semplice iperplasia della mucosa con degenerazione polipoide fino ad una franca poliposi¹¹⁻¹⁶.

In questo contesto estremamente complesso, un ruolo non trascurabile ai fini del rimodellamento tissutale, viene svolto dal metabolismo della ECM con rottura della lamina basale ed erniazione del tessuto connettivo ricoperto da tessuto epiteliale⁴⁻⁷.

Alcuni autori hanno rilevato la presenza di edema e formazione di pseudocisti in sede

sottomucosa, dovuti alla ritenzione di proteine plasmatiche, ed in particolar modo di albumina, secondo un meccanismo patogenetico non ancora del tutto definito¹⁷⁻²⁰.

Le componenti più importanti del sistema proteolitico coinvolto nel fisiologico rimodellamento dell'ECM sono rappresentate dalle Metalloproteinasi (MMPs) e dai loro Inibitori Tissutali (TIMPs, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases); l'integrità della ECM è assicurata da un equilibrio dinamico e costante tra sintesi e degradazione di queste sue componenti²¹.

Per tale motivo alcuni autori hanno indagato sul possibile ruolo che queste proteine svolgono nell'eziopatogenesi della poliposi naso-sinusale²²⁻²⁴.

In letteratura non esistono ricerche che abbiano valutato i possibili meccanismi di degradazione e sintesi della ECM e, dunque, le concentrazioni di MMPs e dei loro inibitori tissutali in relazione alla diversa eziopatogenesi della poliposi naso-sinusale; l'obiettivo della nostra ricerca è quello di determinare:

1. l'espressione di MMP-2, MMP-7 e MMP-9 e dei loro inibitori tissutali TIMP-1 e TIMP-2, nella mucosa sinusale di pazienti affetti da poliposi nasale;
2. i livelli tissutali di MMP-2, MMP-7, MMP-9 e dei loro inibitori tissutali TIMP-1 e TIMP-2 nelle diverse categorie di soggetti affetti da poliposi naso-sinusale;
3. l'espressione tissutale di MMPs e TIMPs con la ripresa della malattia dopo trattamento chirurgico endoscopico.

Capitolo 4

MATERIALE E METODI

4.1 CAMPIONI

Sono stati reclutati, nel periodo compreso tra marzo del 2010 e novembre del 2011, presso la Clinica Otorinolaringoiatrica della Seconda Università degli Studi di Napoli, 55 pazienti (35 maschi, 20 femmine) di età compresa tra 22 e 66 anni (età media 40,2 anni), di cui 45 pazienti (30 maschi e 15 femmine) affetti da poliposi naso-sinusale resistente alla terapia medica e candidati al trattamento chirurgico e 10 (5 maschi e 5 femmine) affetti da deviazione del setto nasale ed ipertrofia dei turbinati inferiori. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un'accurata valutazione anamnestica al fine di evidenziare le possibili diatesi immunoflogistiche (rinite ed eventuale rinocongiuntivite stagionali o perenni con ostruzione nasale più o meno marcata) nonché le eventuali condizioni cliniche sindromiche associate (concomitante presenza di asma allergico, intolleranza all'acido acetilsalicilico, vasculiti). Successivamente si è proceduto ad una valutazione clinica di tali soggetti mediante Nasal Symptom Score, rinoscopia con ottica rigida di 2,7 mm a 0°, 30°, 45° e 70°, TC ad alta risoluzione del distretto naso-sinusale ed indagini rinoallergologiche su siero (PRIST e RAST) e su cute (PRICK test) nei casi con storia di atopia.

Sulla base dei risultati delle indagini effettuate, i pazienti reclutati sono stati suddivisi in 4 gruppi:

- Gruppo A: 15 pazienti con *poliposi nasale associata a iperreattività nasale allergica*, di cui 11 polisensibili e 4 monosensibili;

- Gruppo B: 12 soggetti con *poliposi nasale e quadri sindromici*, di cui 5 con fibrosi cistica, 4 con Malattia di Widal (poliposi, intolleranza all'ASA ed asma bronchiale), 3 con sindrome di Churg-Strauss (angioite granulomatosa, eosinofilia, poliposi e asma);
- Gruppo C: 18 casi con *poliposi nasale associata ad alterazioni morfostruturali del distretto naso-sinusale e conseguenti fenomeni disventilatori del complesso osteomeatale (COM)*, quali deviazioni del setto con concha bullosa del turbinato medio (12 pazienti), curvatura paradossa del turbinato medio (3 pazienti) e contatto turbino-settale (3 pazienti, di cui 2 con curvatura paradossa del turbinato medio);
- Gruppo D: 10 pazienti, che hanno costituito il gruppo controllo, candidati ad intervento chirurgico di settoplastica funzionale e turbinotomia inferiore bilaterale non affetti da rinosinusite cronica associata a poliposi nasale.

I 45 pazienti affetti da poliposi nasale sono stati sottoposti ad un intervento di *chirurgia endoscopica funzionale* ed i campioni di tessuto polipoide nasale, sono stati prelevati, durante l'intervento chirurgico, dalla bulla etmoidale o dal seno mascellare.

Nei 10 casi di controllo è stata prelevata mucosa dalla testa del turbinato medio.

Il *follow-up* clinico dei pazienti ha previsto una rinosfibroscopia di controllo a 1-3 - 6 e 12 mesi ed una TC del distretto naso-sinusale a 6 e 12 mesi dall'intervento chirurgico.

I soggetti appartenenti al gruppo di studio sono stati sottoposti ad intervento di polipectomia ed i campioni chirurgici sono stati studiati con metodiche immunoistochimiche e di biologia molecolare quali il Western Blot e la reazione di retrotrascrizione a catena della polimerasi (RT-PCR). In ciascun campione

abbiamo studiato le Metalloproteasi (MMPs) 2, 7 e 9 e gli inibitori tissutali delle Metalloproteasi (TIMPs) 1 e 2.

Da ciascun campione, sono stati ottenuti quattro frammenti, di cui, due destinati all'analisi morfologica sono stati quindi fissati in formalina tamponata, uno per la valutazione istochimica e morfometrica, uno per l'immunoistochimica ed immunofluorescenza; altri due frammenti destinati all'analisi molecolare, sono stati conservati a -80° C, uno per la valutazione proteica quantitativa mediante il Western Blot, uno per la valutazione degli acidi nucleici attraverso la reazione di retrotrascrizione a catena della polimerasi (RT-PCR).

Le valutazioni morfologiche e molecolari sono state effettuate presso le sezioni di Anatomia Umana del Dipartimento di Medicina e di Scienze della Salute dell'Università degli Studi del Molise e del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Tutti i pazienti ed i familiari dei donatori hanno dato il loro Consenso Informato all'utilizzo dei campioni per la ricerca.

Lo studio è stato approvato dai Comitati Etici delle Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e della Seconda Università degli Studi di Napoli e dal Comitato Bioetico dell'Università degli Studi del Molise ed è stato svolto nel rispetto dei principi e delle norme enunciate nella Dichiarazione di Helsinki.

4.2 IMMUNOISTOCHIMICA

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sottoposti a taglio al microtomo ottenendo sezioni seriate dello spessore di 4 μm .

Le sezioni seriate dello spessore di 4 μm sono state sottoposte a sparaffinatura, successivamente reidratate sottoposte a tre lavaggi in PBS ed immerse per 3' in H_2O_2 allo 0,3% per neutralizzare l'attività perossidasi endogena; le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari, in camera umida per un'ora a 37° C oppure overnight a 4° C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti: monoclonali contro Metalloproteasi 2 (MMP-2) 1:500; Metalloproteasi 7 (MMP-7) 1.250 e Metalloproteasi 9 (MMP-9) 1:200 (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), policlonali contro l'Inibitore Tissutale delle Metalloproteasi 1 (TIMP-1) 1:500 (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) e l'Inibitore Tissutale delle Metalloproteasi 2 (TIMP-2) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA, USA).

I vetrini sono stati quindi sottoposti a numerosi lavaggi in PBS e poi incubati con gli anticorpi secondari sviluppati in coniglio e coniugati con perossidasi (Dako, Carpenteria CA, U.S.A.), in camera umida per un'ora a 37° C.

Le sezioni dopo essere state lavate ripetutamente in PBS sono state incubate con il complesso avidina-biotina perossidasi (ABC/HRP; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) per 30'.

La reazione di colorazione è stata sviluppata con una soluzione di 0,6 mg/ml di DAB (diaminobenzidina idrocloride) contenente H_2O_2 allo 0,03% per 10'.

Le sezioni sono infine state sottoposte a colorazione nucleare con Ematossilina e

successivamente montate in soluzione acquosa di glicerolo.

L'osservazione è stata fatta con un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystem, Inc, Bannockburn, III, Germania) connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica LC200.

I campioni sono stati valutati da tre osservatori indipendenti utilizzando una scala arbitraria di 4 valori che vanno dall'assenza di immunopositività (-) a quella massima (+++).

Un avanzato software per analisi di immagine computerizzato (Quantimet 520, Leica, Solms, Germany) è stato inoltre utilizzato per una valutazione semiquantitativa della immunopositività delle sezioni.

Le immagini sono state acquisite direttamente attraverso un microscopio ottico Leitz Axiophot (Leitz, Wetzlar, Germany) all'ingrandimento x 20 attraverso una videocamera specializzata (DC 200, Leica).

Le aree istologiche esaminate sono state digitalizzate e successivamente esaminate attraverso il software. La qualità ottica di queste aree è stata ottimizzata modificandone la luminosità ed il contrasto.

Le aree immunopositive sono state evidenziate dal programma sulla base di una scala di grigi e misurate.

La superficie occupata dagli antigeni marcati è stata espresso come percentuale di aree positive per la immunocolorazione rispetto alla totalità del campione esaminato (pixels colorati/pixels totali).

Questa misurazione è stata realizzata per cinque sezioni di ciascun campione e di ciascun campione sono stati esaminati 6 campi; i valori riportati si riferiscono alla media delle misurazioni di tutti i campi per ciascuna sezione.

Anche questa analisi è stata effettuata utati da tre osservatori indipendenti e la

valutazione è avvenuta “in cieco”.

4.3 WESTERN BLOT

I campioni sono stati lavati in PBS e lisati incubandoli per 30' a 4° C con un buffer di lisi (1% Triton X-100 in PBS), contenente inibitori delle proteasi alle concentrazioni riportate nel seguente schema:

- EDTA 10 ml
- PMSF 10 ml
- Tripsina/chimotripsina 10 ml
- Leupeptina 4.6 ml
- E-64 3.6 ml
- Aprotinina 10 ml

I lisati sono stati centrifugati per 30' a 10000 rpm (rotazioni per minuto) a 4° C; la concentrazione di proteine nei campioni è stata dosata usando un kit colorimetrico (Bio-Rad, Richmond, CO, USA).

Attraverso la lettura spettrofotometrica a 750 nm è stato possibile ottenere i valori dell'assorbanza, che hanno permesso di costruire la retta di taratura necessaria alla determinazione della concentrazione dei campioni.

Una eguale quantità di proteine totali pari a 100 mg è stata aggiunta al Laemmli buffer quindi separata su un gel di SDS (sodio dodecil solfato)-acrilammide al 30 % in condizioni denaturanti.

Il gel è stato successivamente sottoposto ad elettroblotting su una membrana di PVDF (polyvinylidene difluoride) (Millipore, Bedford, Mass., USA) e le bande così ottenute sono state evidenziate colorando la membrana con il colorante di Ponceau.

Il colorante in eccesso è stato rimosso mediante successivi lavaggi in PBS tween

20 e la membrana è stata posta in una capsula Petri e bloccata per 1h in latte privo di grassi al 6%.

Rimosso il latte, dopo tre lavaggi in opportuna soluzione di lavaggio la membrana è stata incubata overnight a 4°C con gli anticorpi primari contro Metalloproteasi 2, 7 e 9 e contro TIMP-1 (Sigma, St.Louis, Missouri, USA), e anti-TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Santa Cruz, CA, USA).

La membrana è stata quindi lavata in PBS tween 20 per 30' e successivamente incubata in latte in presenza dell'anticorpo secondario.

Per la rivelazione dell'anticorpo primario specifico sono state usate IgG di capra anti-topo complessate con perossidasi alcalina di rafano, alla diluizione di 1:3000 (Bio-Rad, Richmond, CO, USA), con una incubazione di 45' a temperatura ambiente.

Dopo ulteriori lavaggi in PBS tween 20, la membrana è stata visualizzata dopo essere stata sviluppata in luminol ed esposta su ECL film (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) per Metalloproteasi 2, 7, 9 e TIMP-1 e ECLplus (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) per MMP-2.

Le immagini ottenute sono state acquisite al computer e quantificate attraverso l'utilizzo di un software analitico ImageQuant (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

4.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

I campioni (150-300 mg) di polipi nasali criopreservati a -80° C sono stati lisati con la soluzione di Triazol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, Md, USA), secondo il protocollo consigliato dalla ditta per ottenere l'RNA totale.

L'RNA totale è stato isolato e quindi precipitato e quantizzato mediante analisi spettrofotometrica con lo spettrofotometro Eppendorf Bio Photometer (Eppendorf AG, Germania) leggendo i valori di assorbanza a 260 nm e 280 nm.

Per stimare la qualità dell'RNA estratto si valuta il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm (DNA) e quella a 280 nm (proteine) con un rapporto ideale intorno a 1.8 - 2.

Per ogni campione 2 mg dell'RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA (DNA complementare), usando il kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, Illinois, USA) secondo il protocollo consigliato dalla ditta.

Il cDNA (3 ml) di ciascun campione è stato amplificato con una RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) utilizzando un set di primer preparati per i geni delle proteine target studiate e per il gene housekeeping GAPDH (Gliceraldeide fosfato deidrogenasi) utilizzato quale doppio controllo interno alla reazione.

Il rapporto tra i campioni ed il gene housekeeping è stato calcolato per normalizzare le variazioni iniziali tra la concentrazione dei campioni e per il controllo dell'efficienza della reazione.

I primer sono stati disegnati utilizzando il software Primer 3 (sviluppato da Steve Rozen, Helen J Skaletsky) disponibile on-line al seguente indirizzo web:

<http://www-genome.wi.mit.edu> e sono riassunti nella Tabella 1.

È stata poi effettuata una PCR semiquantitativa utilizzando un ciclatore termico Techgene Thermal Cycler (Krackler Scientific Inc., USA) secondo il seguente protocollo: denaturazione iniziale a 95°C per 5'; 25 cicli successivi effettuati a 95°C per 1'; 55°C per 1'(temperatura di annealing); a 72°C per 1'; estensione finale a 72°C per 10'.

Il volume totale della reazione è stato di 50 µl che comprendevano: 3 µl di cDNA, 10-20 pmol di ciascun primer, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM buffer di reazione, RNase e DNase free H₂O.

In ciascun esperimento la possibile contaminazione del DNA è stata determinata introducendo un controllo interno in cui il cDNA è stato omesso dalla mix di reazione e sostituito da RNase e DNase free H₂O.

Ogni prodotto amplificato (12 µl) è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio; il gel è stato poi osservato su di un transilluminatore agli UV (luce ultravioletta), fotografato e le immagini sono state acquisite al computer.

I livelli dell' RNA messaggero (mRNA) delle proteine studiate sono stati infine valutati attraverso lettura densitometrica e normalizzati con i valori del GAPDH. L'analisi densitometrica è stata fatta utilizzando il software ImageJ v1.29 (sviluppato da Wayne Rasband) disponibile on-line all'indirizzo web <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Tutti i prodotti della PCR sono stati purificati utilizzando il QIAquick PCR purification kit (Qiagen CA, USA) e la loro sequenza è stata verificata attraverso il metodo chimico di terminazione del didesossi, sequenziando il DNA secondo il forward ed il reverse con un sequenziatore automatico Applied

biosystem Model 373A (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

4.5 ANALISI STATISTICA

Il software SPSS (versione 10.1; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) è stato utilizzato per l'analisi statistica.

Le variabili continue sono state espresse come media \pm DS (Deviazione Standard).

I valori della rinofibroscopia sono stati confrontati attraverso il test del chi quadro (χ^2).

I valori della immunoistochimica, Western Blot, e PCR sono stati confrontati con un test del tipo t di Student per variabili non appaiate.

Le differenze tra i diversi gruppi di studio sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza con la correzione di Bonferroni.

Target mRNA	Primer	Sequence	PCR Product (bp)
GAPDH	Forward	5' GAGTCAACGGATTTGGTC 3'	238
	Reverse	5' TTGATTTTGGAGGGATCT 3'	
MMP-2	Forward	5' GGCCGACATCATGGTACTCT 3'	178
	Reverse	5' GAGGTTGTTTCCATGCAGGT 3'	
MMP-7	Forward	5' CAGAGAAGGCACACAAACGA 3'	172
	Reverse	5' CACTGGTGAGACAGGCTTGA 3'	
MMP-9	Forward	5' TTGACAGCGACAAGAAGTGG 3'	179
	Reverse	5' GCCATTTCACGTCGTCCTTAT 3'	
TIMP-1	Forward	5' GAAGGGAACCGAGCCTATTC 3'	181
	Reverse	5' GGGCACATTTGCACATACAG 3'	
TIMP-2	Forward	5' CCACAAATGGCATCTACACG 3'	190
	Reverse	5' CCCAGCCAATATTCTCCTGA 3'	

Tabella 1: Sequenze dei Primers utilizzati per gli esperimenti di RT-PCR e valore di ciascun prodotto ottenuto dall'amplificazione espresso come coppie di basi.

Capitolo 5

RISULTATI

5.1 RINOFIBROSCOPIA

I controlli rinoskopici effettuati durante il follow-up (a 1-3-6 e 12 mesi) hanno mostrato una ripresa della malattia in 6 dei 15 pazienti con diatesi allergica (gruppo A) (40%), in 9 dei 12 pazienti con quadri sindromici (gruppo B) (75%) e solo in 2 pazienti con alterazioni morfo-strutturali (gruppo C) (5,5%).

L'analisi di tali risultati ha mostrato una più alta percentuale di ripresa della malattia nei sindromici (gruppo B) se confrontati con i pazienti allergici (gruppo A), tuttavia non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ($\chi^2 = 2.15$, $p = 0.15$).

È stata documentata, invece, una bassa incidenza di recidive nel gruppo di pazienti con alterazioni morfo-strutturali (gruppo C), rispetto ai pazienti sindromici (gruppo B) e ai pazienti allergici (gruppo A) ($\chi^2 = 11.51$, $p < 0.001$ e $\chi^2 = 4.73$, $p = 0.03$ rispettivamente) con valori statisticamente significativi (Figura 6).

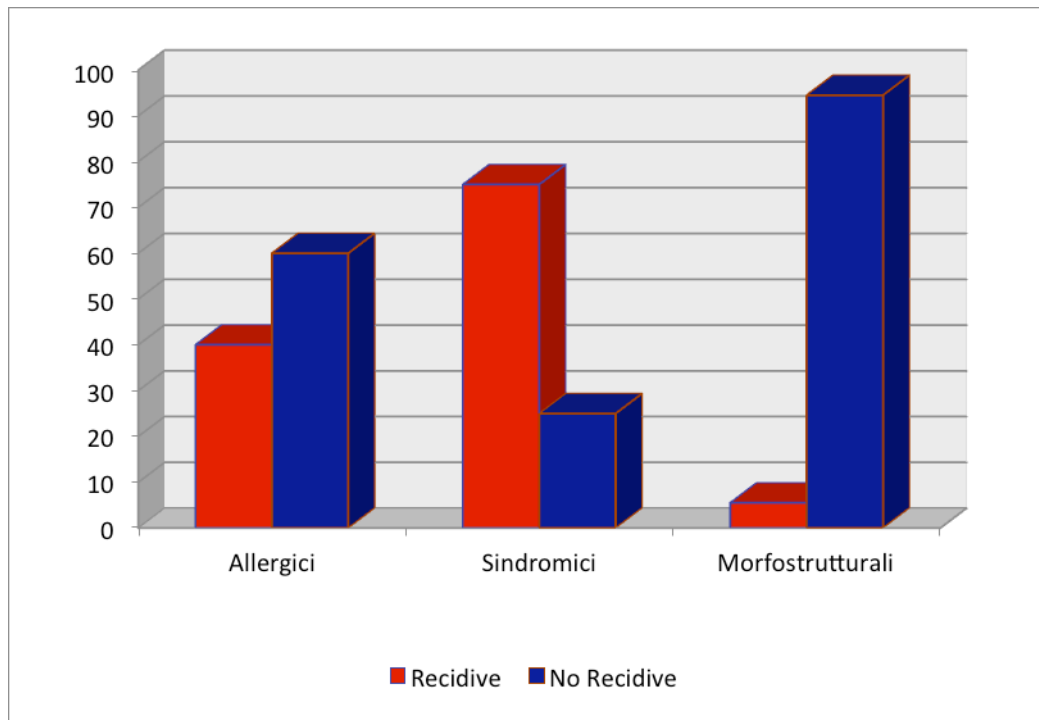


Figura 6: Percentuale di recidive a 24 mesi di follow-up, nei tre gruppi di pazienti affetti da poliposi nasale: allergici, sindromici e morfo-strutturali.

5.2 IMMUNOISTOCHIMICA

I dati dell'analisi immunoistochimica hanno permesso di comparare l'espressione delle MMPs e dei TIMPs così come riportato nella Tabella 2 (Tab. 2); i valori espressi si riferiscono all'analisi dell'immagine effettuata attraverso un software specifico.

Analizzando i risultati della Tabella 2, possiamo notare un incremento dell'immunopositività per MMP-9, MMP-7 e MMP-2 nei soggetti affetti da poliposi rispetto ai campioni dei soggetti di controllo.

Si evince inoltre una riduzione dell'immunostaining di TIMP-1 e TIMP-2 nei campioni dei pazienti affetti da poliposi nasale rispetto ai controlli (statisticamente significativo con $p < 0.001$).

In particolare sono state valutate le immunopositività delle singole MMPs 9, 7 e 2 e di TIMPs 1 e 2, distintamente nei tre singoli gruppi di pazienti affetti da poliposi nasosinusale, così come riportato nella Tabella 2; dall'analisi dei dati si evidenzia come l'espressione di MMPs (9, 7 e 2) risulta essere maggiore nel gruppo di pazienti con sindromi geneticamente determinate (gruppo B) rispetto ai gruppi di pazienti con allergia (gruppo A) e con alterazioni morfostrutturali (gruppo C) ($p < 0.001$); così come l'espressione di TIMPs (1 e 2) sono maggiormente ridotte nei pazienti appartenenti al gruppo B rispetto ai pazienti appartenenti ai gruppi A e C ($p < 0.001$) ovvero gli allergici ed i morfostrutturali.

È necessario sottolineare che la MMP-9 risulta maggiormente espressa rispetto alle altre due studiate (2 e 7), così come TIMP-1 è mostra una minore espressione rispetto a TIMP-2. Nei pazienti del gruppo B si osserva una maggiore immunopositività per tutte le MMPs studiate e una minore espressione di TIMPs rispetto ai gruppi A e C (Tab. 2).

È possibile analizzare graficamente l'espressione di MMPs e di TIMPs nei tre gruppi

(A, B, e C) di pazienti affetti da poliposi naso sinusale nelle Figure 7 e 8 (Fig.7 e Fig.8).

Nella figura 9 sono invece mostrate alcune immagini relative all'immunopositività per le molecole studiate nei pazienti affetti da poliposi.

	MMP-9	MMP-7	MMP-2	TIMP-1	TIMP-2
Group A: Allergic patients	1.588 ± 0.2	1.111 ± 0.1	1.505 ± 0.2	0.455 ± 0.03	0.564 ± 0.01
Group B: Morphostructural diseases of paranasal sinus	1.322 ± 0.2	1.001 ± 0.2	1.243 ± 0.2	0.622 ± 0.02	0.756 ± 0.01
Group C: Syndromic patients	2.001 ± 0.1	1.754 ± 0.4	1.753 ± 0.2	0.321 ± 0.01	0.499 ± 0.01
Control group	0.456 ± 0.2	0.656 ± 0.07	0.344 ± 0.09	1.545 ± 0.1	1.234 ± 0.1

Tabella 2: Espressione tissutale di MMP-9, MMP-7, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nei gruppi di pazienti con poliposi nasale e nel gruppo controllo studiati attraverso un software analisi di immagine computerizzata.

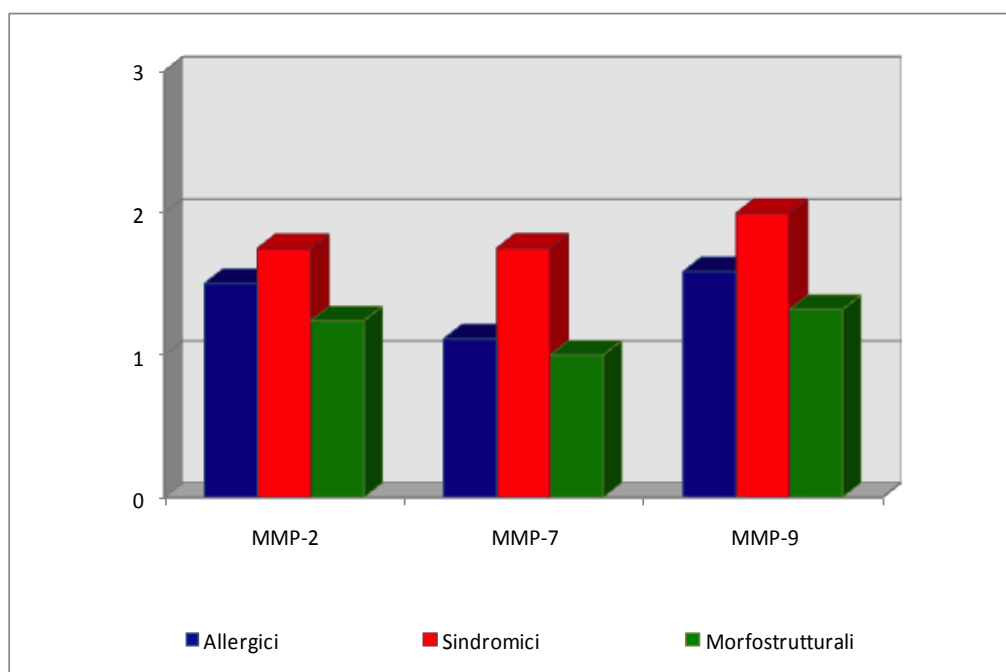


Figura 7: Confronto dell'espressione tissutale di MMP-2, MMP-7 e MMP-9 tra i tre gruppi di pazienti con poliposi nasale: allergici, sindromici e morfostrutturali.

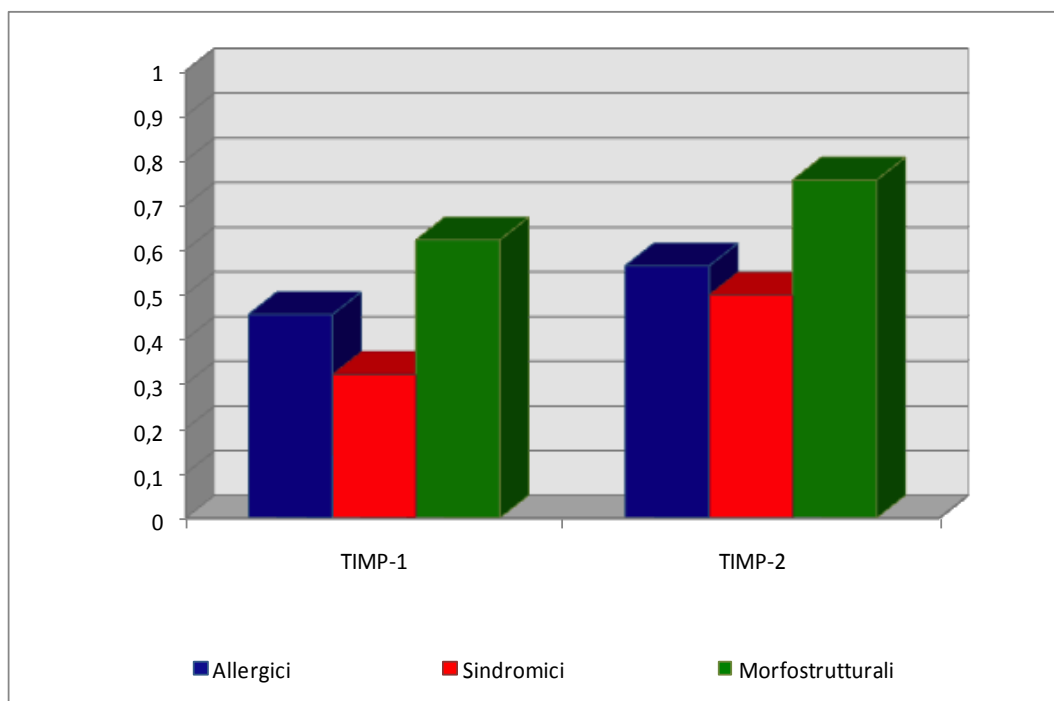
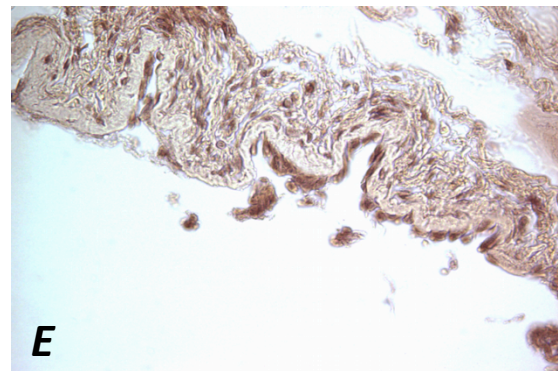
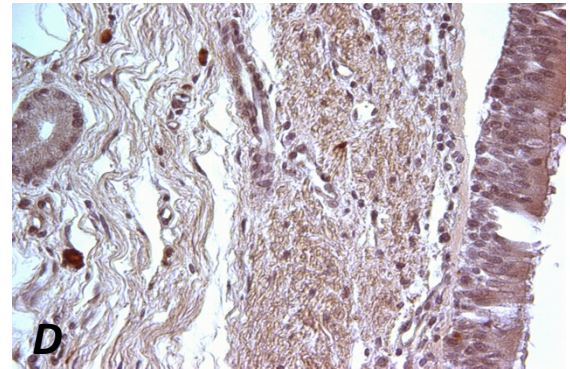
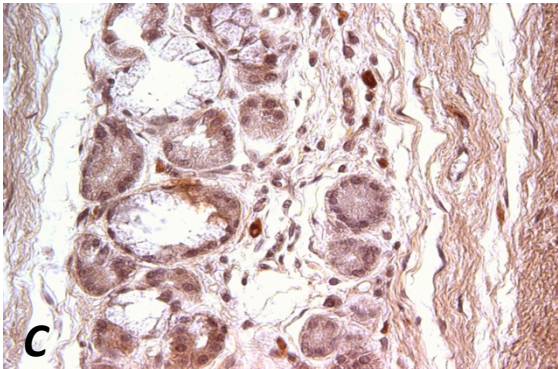
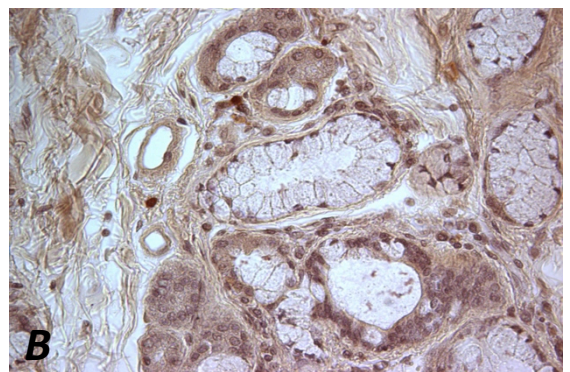
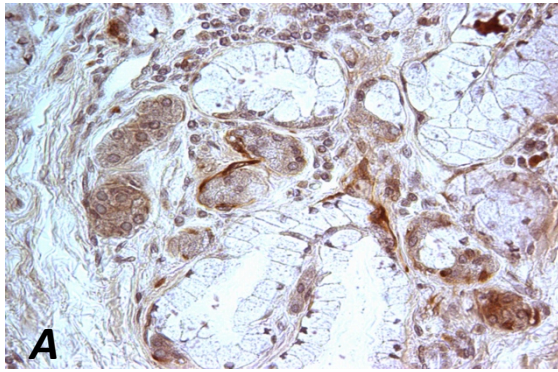


Figura 8: Confronto dell'espressione tissutale di TIMP-1 e TIMP-2 tra i tre gruppi di pazienti con poliposi nasale: allergici, sindromici e morfostrutturali.



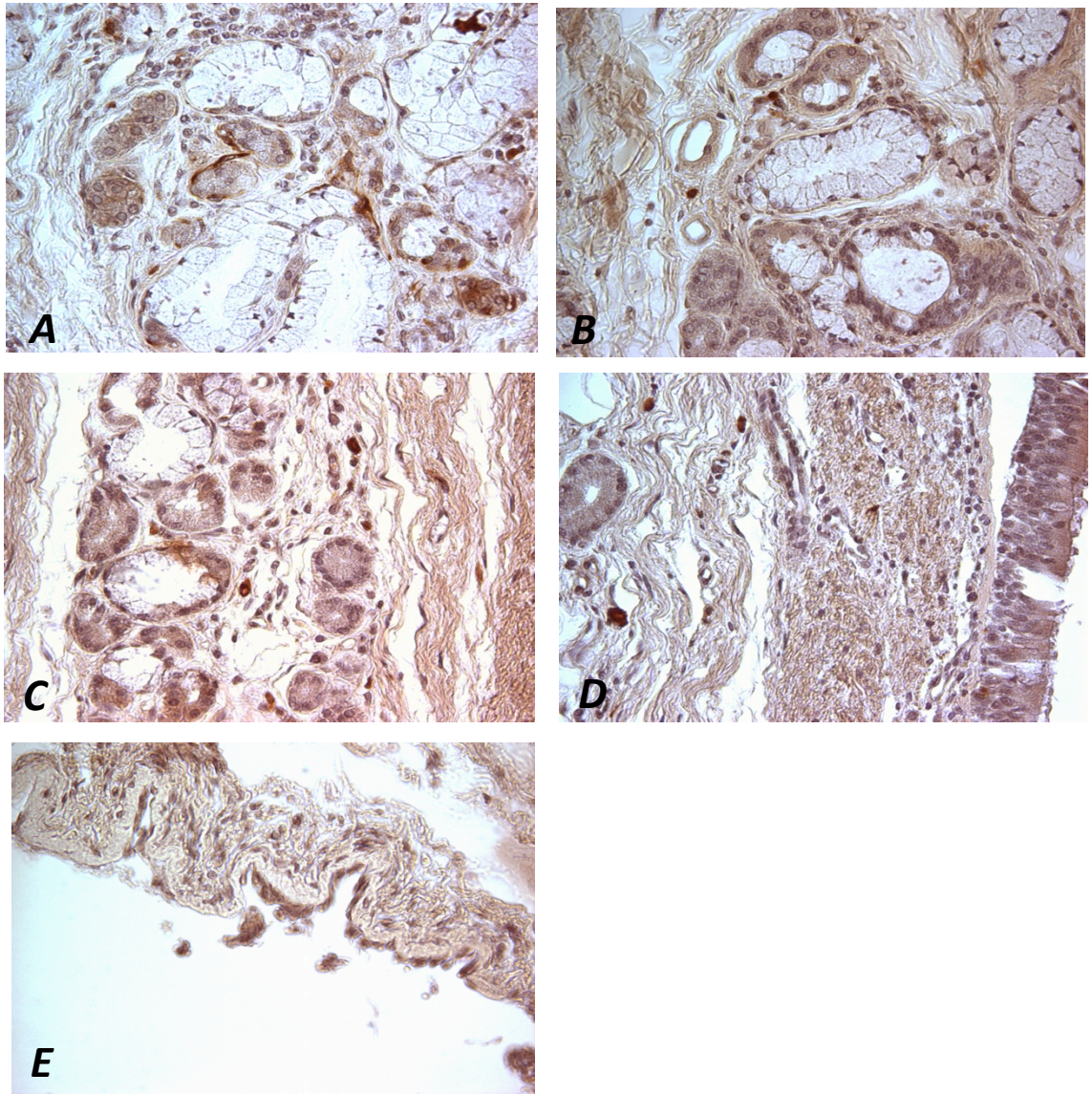


Figura 9: Immunopositività per MMP-2 (A), MMP-7 (B), MMP-9 (C), TIMP-1 (D), TIMP-2 (E) in soggetti affetti da poliposi nasale; la marcatura si localizza prevalentemente a livello della componente stromale subepiteliale e perighiandolare a livello della lamina propria. La metodica utilizzata è l'ABC-HRP (Complesso Avidina Biotina-Perossidasi di Rafano). Ingrandimento x 40.

5.3 WESTERN BLOT

L'analisi della quantità proteica delle singole MMPs 9, 7 e 2 e di TIMPs 1 e 2 è stata effettuata mediante Western Blot.

Nei pazienti affetti da poliposi nasale la quantità di MMPs è maggiore rispetto al gruppo di controllo; per quanto concerne le TIMPs viceversa i pazienti affetti da poliposi nasale mostrano un quantitativo di proteine significativamente ridotto rispetto ai controlli.

Dall'analisi dei dati si evidenzia come nei pazienti del gruppo B si osserva una maggiore quantità di tutte le MMPs studiate e una minore quantità di TIMPs rispetto ai gruppi A e C; questo dato ricalca del tutto la valutazione immunohistochimica evidenziata nella Tabella 2 e nei grafici rappresentati nelle Figure 7 e 8.

È necessario sottolineare che anche attraverso l'immunoblotting la quantità di MMP-9 risulta maggiormente rispetto alle altre due studiate (MMP-2 e MMP-7), così come la concentrazione proteica di TIMP-1 è significativamente minore rispetto a quella di TIMP-2. I dati del Western Blot sono efficacemente riassunti nella Figure 10, 11, e 12.

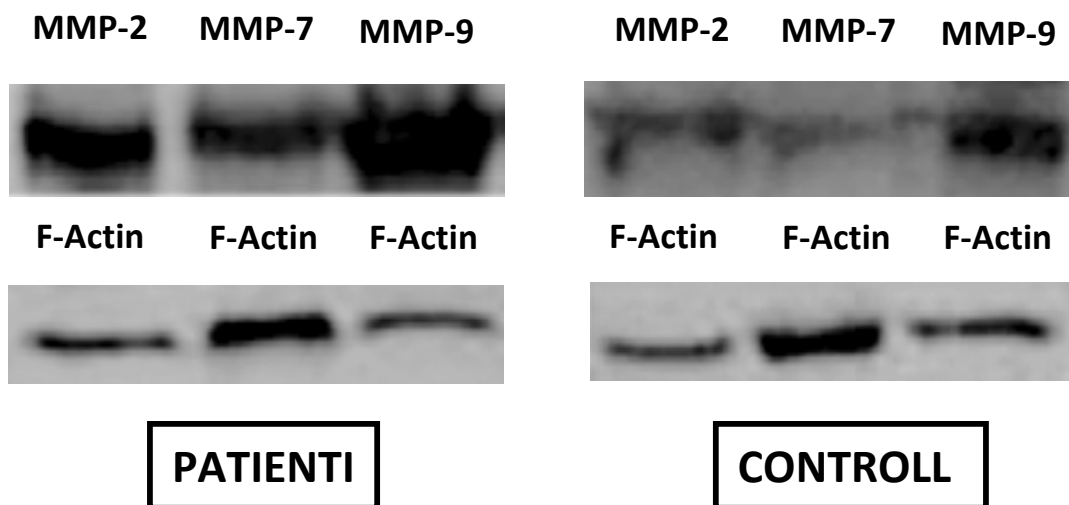


Figura 10: Gel di Agarosio esemplificativo dei risultati del Western Blot. Viene mostrata l'espressione delle Metalloproteasi (MMPs) nei pazienti con poliposi nasale (Pazienti) e nel gruppo di controllo (Controlli).

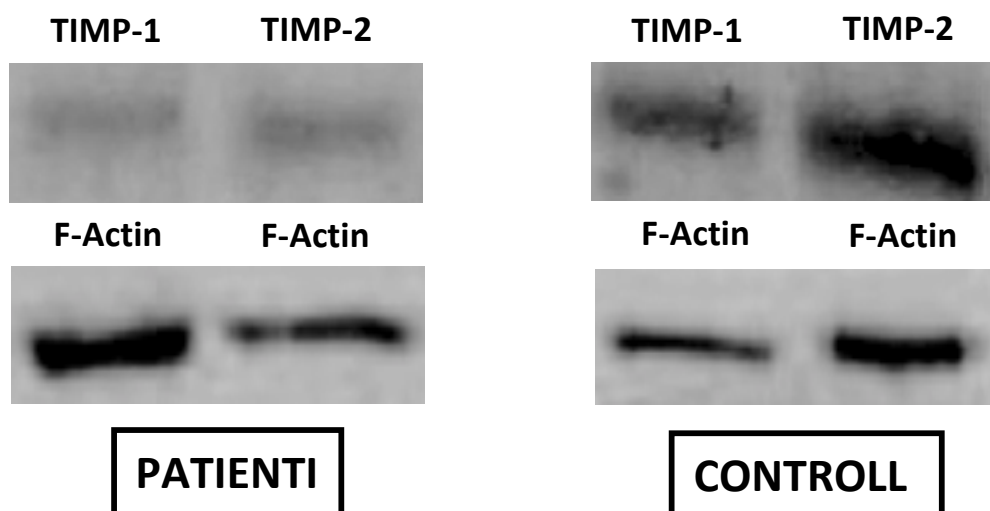


Figura 11: Gel di Agarosio esemplificativo dei risultati del Western Blot. Viene mostrata l'espressione degli inibitori delle Metalloproteasi (TIMPs) nei pazienti con poliposi nasale (Pazienti) e nel gruppo di controllo (Controlli).

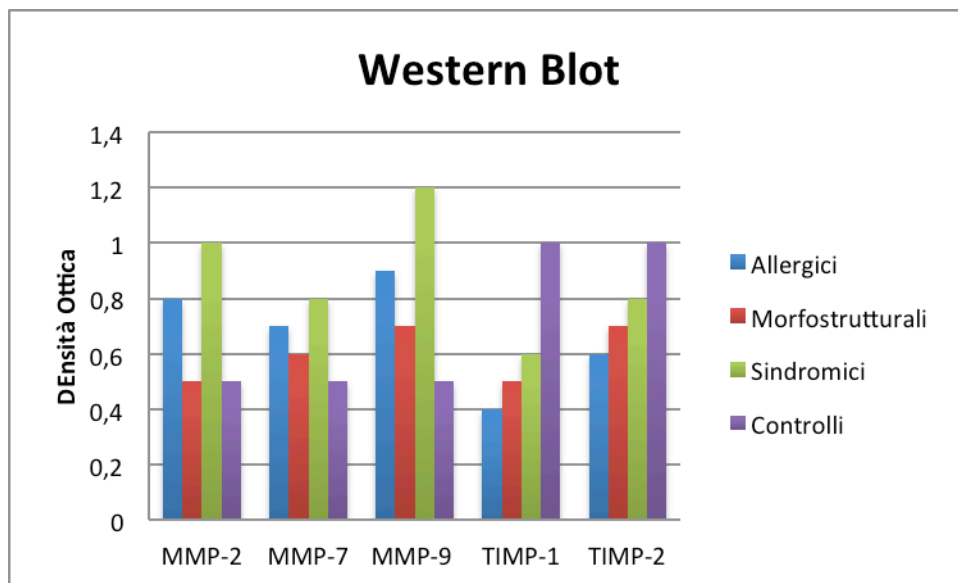


Figura 12: Rappresentazione grafica dei risultati del Western Blot nei pazienti affetti da poliposi nasale e dei soggetti di controllo.

5.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

I livelli di mRNA delle Metalloproteasi e degli Inibitori studiati è stata effettuata attraverso la reazione a catene della polimerasi (RT-PCR).

I dati complessivamente concordano con quelli dell'analisi immunoistochimica e del Western Blot.

Infatti i pazienti del gruppo B presentano una maggiore quantità di mRNA per tutte le MMPs studiate e una minore quantità di TIMPs rispetto ai gruppi A e C.

Come già evidenziato dall'immunoistochimica e confermato dal dosaggio proteico mediante immunoblotting i livelli di mRNA per MMP-9 risultano superiori rispetto a quelli di MMP-2 e MMP-7.

Allo stesso modo i livelli di mRNA per TIMP-1 sono ridotti rispetto a quelli di TIMP-2.

I dati della RT-PCR sono riassunti nelle Figure 13, 14, e 15.

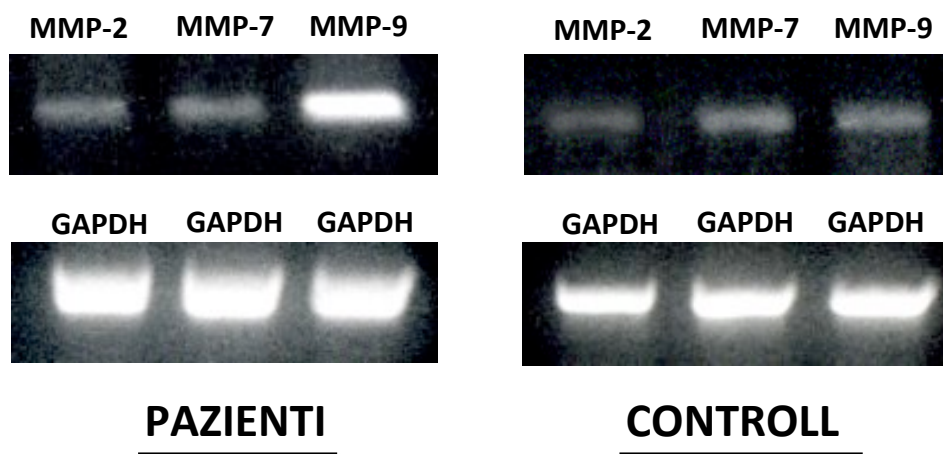


Figura 13: Gel di Agarosio esemplificativo dei risultati della RT-PCR. Viene mostrata l'espressione dell'mRNA per le Metalloproteasi (MMPs) nei pazienti con poliposi nasale (Pazienti) e nel gruppo di controllo (Controlli).

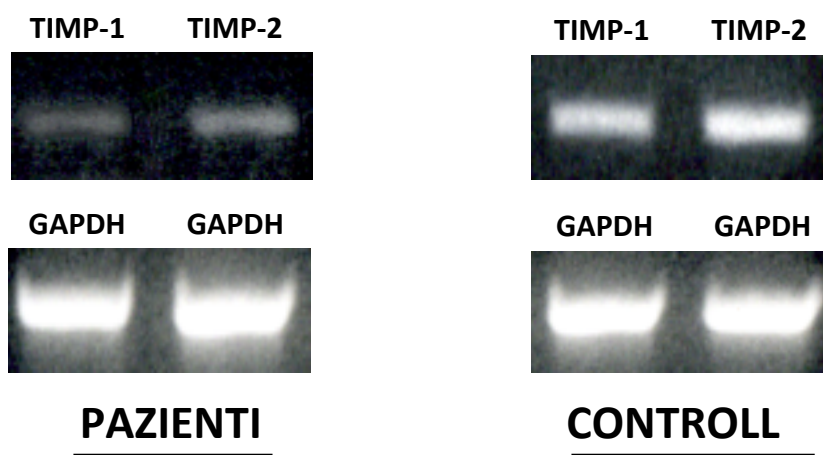


Figura 14: Gel di Agarosio esemplificativo dei risultati della RT-PCR. Viene mostrata l'espressione dell'mRNA degli inibitori delle Metalloproteasi (TIMPs) nei pazienti con poliposi nasale (Pazienti) e nel gruppo di controllo (Controlli).

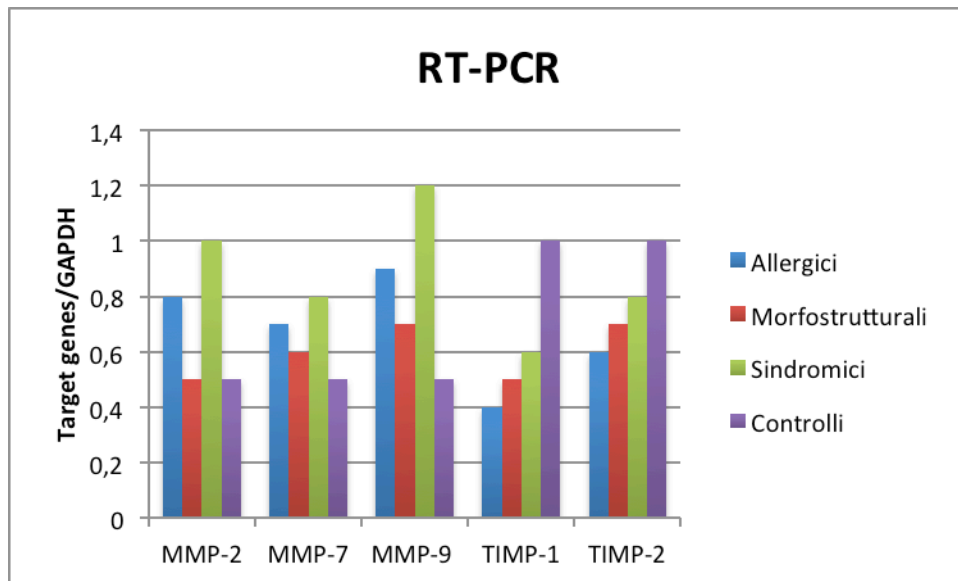


Figura 15: Rappresentazione grafica dei risultati della RT-PCR nei pazienti affetti da poliposi nasale e dei soggetti di controllo.

Capitolo 6

DISCUSSIONE

Le metalloproteinasi e i loro inibitori tissutali sembrano svolgere un ruolo importante nel bilancio tra produzione e degradazione delle singole componenti della ECM e, dunque, nella patogenesi della poliposi nasale. Diversi studi di ricerca presenti in letteratura hanno documentato che le MMPs maggiormente implicate nella genesi della poliposi naso-sinusale sono le MMP 9 e 7²⁵⁻²⁹ mentre il ruolo di MMP-2 è ancora in discussione³⁰⁻³².

Tuttavia, la sola overespressione di MMP-9 e -2 non può essere l'unica spiegazione per il rimodellamento tissutale presente nella poliposi nasale, in quanto elevate concentrazioni di MMP-9 sono state riscontrate anche nella rinosinusite cronica senza poliposi. È necessario, quindi, analizzare altri parametri per spiegare le differenze nel rimodellamento tissutale e, a tal riguardo, bisogna valutare l'espressione degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi, in particolare di TIMP-1. Nella rinosinusite cronica è stata riscontrata una sovraespressione di TIMP-1 insieme a quella di MMP-9, non determinando alcuna alterazione del fisiologico rapporto MMP-9/TIMP-1; al contrario, nella poliposi nasale l'espressione di TIMP-1 appare non significativamente elevata^{31,34} o addirittura inferiore rispetto al gruppo controllo, determinando uno squilibrio tra MMP-9 e TIMP-1 che si traduce in un incremento notevole del rapporto MMP-9/TIMP-1³⁵⁻³⁶. La ridotta espressione di TIMP-1 in tali pazienti potrebbe, quindi, promuovere gli effetti di MMP-9 e contribuire al rimodellamento tissutale che caratterizza la poliposi nasale³⁴. Un recente studio ha, inoltre, analizzato l'espressione di un altro inibitore tissutale, TIMP-2, riscontrando anche per quest'ultimo, livelli significativamente

maggiori in pazienti con rinosinusite cronica senza poliposi rispetto a soggetti affetti da rinosinusite cronica con poliposi³⁵.

Il presente studio di ricerca si è proposto di confrontare le concentrazioni di MMP-2, MMP-7 e MMP-9, e dei loro inibitori tissutali, TIMP-1 e TIMP-2, mediante il metodo immunostochimico, nel tessuto neoformato di pazienti affetti da poliposi naso-sinusale e nella mucosa dei turbinati nei pazienti non affetti da poliposi naso sinusale.

È stato dimostrato un incremento delle concentrazioni di MMP-9, MMP-7 e MMP-2 ed una riduzione delle concentrazioni di TIMP-1 e TIMP-2 in pazienti affetti da poliposi nasale rispetto ai controlli, in accordo con i dati della letteratura internazionale³⁶⁻⁴⁰.

Tuttavia sulla base del confronto tra le concentrazioni di tali molecole nelle diverse categorie eziopatogenetiche dei pazienti affetti da poliposi nasale le nostre indagini forniscono dati del tutto innovativi rispetto a quanto presente nella letteratura internazionale sull'argomento; più precisamente l'incremento delle concentrazioni di MMPs (MMP-9, MMP-7 e MMP-2), e la concomitante riduzione dei livelli di TIMP-1 e TIMP-2 appaiono maggiormente evidenti nei pazienti affetti da disordini sindromici rispetto ai soggetti con diatesi allergica o con alterazioni morfostrutturali del distretto naso-sinusale; in effetti non esistono, in letteratura, studi di ricerca che analizzano in tal senso le alterazioni a carico della ECM. Il rapporto MMP/TIMP appare, quindi, aumentato nel tessuto polipoide nasale, rispetto ai controlli, in particolar modo nel gruppo dei pazienti sindromici.

Durante il periodo di follow-up (a 1-3-6 e 12 mesi), abbiamo inoltre potuto osservare una ripresa della malattia nel 75% dei pazienti con quadri sindromici, nel 40% di quelli con diatesi allergica e solo nel 5,5% dei soggetti con alterazioni morfostrutturali.

In sintesi i nostri dati dimostrano che, nel gruppo di pazienti con disordini sindromici, in cui il rapporto MMP/TIMP appare più alto rispetto agli altri gruppi, la percentuale di

recidiva è superiore a quella degli altri pazienti: tale dato indica una correlazione tra i livelli delle metalloproteinasi e dei loro inibitori, in particolare del rapporto MMP/TIMP, e la tendenza alla recidiva dopo trattamento chirurgico della malattia.

Capitolo 7

CONCLUSIONI

In definitiva le nostre indagini documentano che l'alterazione del rapporto MMPs/TIMPs rappresenta un fattore fondamentale non solo nel meccanismo di formazione dei polipi nasali ma anche nella ripresa della malattia.

Il presente studio di ricerca, grazie alla tipizzazione e quantificazione delle MMPs e dei TIMPs nelle differenti condizioni eziopatogenetiche della poliposi nasale (allergiche, sindromiche e da alterazioni morfo-strutturali), fornisce nuovi dati riguardo il ruolo cruciale di tali molecole nello sviluppo delle alterazioni a carico della mucosa e sottomucosa naso-sinusale.

L'elevato rapporto MMPs\TIMPs nei pazienti sindromici rispetto agli allergici e ai morfo-strutturali potrebbe spiegare il maggior rischio di recidive dopo intervento chirurgico e, allo stesso tempo, porrebbe le basi per successivi lavori di ricerca volti allo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici farmacologici ovvero alla scoperta di nuove terapie genetiche finalizzate al controllo della ripresa di malattia.

L'utilizzo di molecole in grado di ridurre il rapporto MMPs/TIMPs, quali inibitori sintetici delle MMPs (peptidomimetici del collagene come batimastat e marimastat e non peptidomimetici come BAY 12-9566, AG3340, CGS-27023 e BMS-275291, derivati delle tetracicline e bisfosfonati)⁴⁰ potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica nella prevenzione delle recidive nei pazienti con poliposi nasale.

BIBLIOGRAFIA

1. Albera R, Rossi G. *Otorinolaringoiatria*. III Edizione 2013, Mineva Medica, Torino.
2. Nissinen L, Kähäri VM. *Matrix metalloproteinases in inflammation*. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar 13. S0304-4165(14)00111-1.
3. Khokha R, Murthy A, Weiss A. *Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol. 2013 Sep;13(9):649-65.
4. Gauchotte G, Marie B, Gallet P, Nguyen DT, Grandhay M, Jankowski R, Vignaud JM. *Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma: a poorly recognized entity with mast cell recruitment and frequently associated with nasal polyposis*. Am J Surg Pathol. 2013 Nov;37(11):1678-85.
5. Yeo NK, Eom DW, Oh MY, Lim HW, Song YJ. *Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in nonrecurrent vs recurrent nasal polyps*. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013 Sep;111(3):205-10.
6. Niarakis A, Giannopoulou E, Ravazoula P, Panagiotopoulos E, Zarkadis IK, Aletras AJ. *Detection of a latent soluble form of membrane type 1 matrix metalloprotease bound with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in periprosthetic tissues and fluids from loose arthroplasty endoprostheses*. FEBS J. 2013 Dec;280(24):6541-55.
7. de Borja Callejas F, Picado C, Martínez-Antón A, Alobid I, Pujols L, Valero A, Roca-Ferrer J, Mullol J. *Differential expression of remodeling markers by tissue structure in nasal polyposis*. Am J Rhinol Allergy. 2013 May-Jun;27(3):e69-74.
8. Wang LF, Chien CY, Chiang FY, Chai CY, Tai CF. *Expression of matrix*

- metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in recurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. Kaohsiung J Med Sci. 2013 Jan;29(1):26-31.
9. Shi LL, Xiong P, Zhang L, Cao PP, Liao B, Lu X, Cui YH, Liu Z. *Features of airway remodeling in different types of Chinese chronic rhinosinusitis are associated with inflammation patterns*. Allergy. 2013 Jan;68(1):101-9.
 10. Malinsky RR, Valera FC, Cavallari FE, Küpper DS, Milaneze C, Silva JS, Tamashiro E, Anselmo-Lima WT. *Matrix metalloproteinases and their impact on sinusal extension in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013 Mar;270(4):1345-8.
 11. Van Crombruggen K, Holtappels G, De Ruyck N, Derycke L, Tomassen P, Bachert C. *RAGE processing in chronic airway conditions: involvement of Staphylococcus aureus and ECP*. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jun;129(6):1515-21.e8.
 12. Wang LF, Chien CY, Chiang FY, Chai CY, Tai CF. *Corelationship between matrix metalloproteinase 2 and 9 expression and severity of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. Am J Rhinol Allergy. 2012 Jan-Feb;26(1):e1-4.
 13. Eyibilen A, Cayli S, Aladag I, Koç S, Gurbuzler L, Atay GA. *Distribution of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in nasal polyposis and chronic rhinosinusitis*. Histol Histopathol. 2011 May;26(5):615-21. PubMed PMID: 21432777.
 14. Yigit O, Acioğlu E, Gelişgen R, Server EA, Azizli E, Uzun H. *The effect of corticosteroid on metalloproteinase levels of nasal polyposis*. Laryngoscope. 2011 Mar;121(3):667-73.
 15. Lee JH, Chung SW, Park IH, Lee SH, Lee SH, Lee HM. *Expression of*

- extracellular matrix metalloproteinase inducer in nasal polyps. Am J Rhinol Allergy.* 2010 Nov-Dec;24(6):127-31.
16. Lechapt-Zalcman E, Coste A, d'Ortho MP, Frisdal E, Harf A, Lafuma C, et al. *Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. J Pathol.* 2001;193:233-41
 17. Wang LF, Chien CY, Tai CF, Kuo WR, Hsi E, Hank Juo SH. *Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms in nasal polyposis. BMC Medical Genetics* 2010;11:85
 18. Larsen L. e Tos M. Origino f Nasal Polyps: an endoscopic autopsy study. *The Laryngoscope* 114:710-719, 2004
 19. C M van Drunen, J M Mjösberg, C L Segboer, M E Cornet, W J Fokkensi. *Role of Innate Immunità in the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis. Curr Allergy Asthma Rep* (2012) 12:120-126
 20. AP Lane. *The role of innate immunity in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis Curr Allergy Asthma Rep.* 2009, 9(3):205-12
 21. W Fokkens, Lund V, Mullol J et al. EP3OS 2012. *European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. Rhinology.* 2012, 50 (1) :1-150
 22. N Prevete, FA Salzano, FW Rossi, F Rivellese, M Dellepiane, L Guastini, R Mora, G Marone, A Salami, A De Paulis. *Role(s) of formyl-peptide receptors expressed in nasal epithelial cells. J Biol Regul Homeost Agents.* 2011 Oct-Dec; 25(4):553-64
 23. Bachert C, Gevaert P., Holtappels G., Cuvelier C., Van Cauwenberge P. *Nasal Polyposis: from cytokines to growth. Am J Rhinol* 2000;14:279-290
 24. Terrier G., Bauman R.P., Pidouk J.M. *Endoscopic and histopathological observation of chronic maxillary sinusitis. Rhinology* 1976;14:129-132

25. Takabayashi T., Kato A., Peters A.T., Hulse K.E., Such L.A. et al. *Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of t-PA expression*. Am J Respir Crit Care Med 2012
26. Watelet J.B., Bachert C., Claeys C., Van Cauwenberge P.. *Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis*. Allergy 2004; 59:54-60
27. Bachert C, Hormann K, Mosges R. *An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis*. Allergy 2003;58:176-91
28. Bhandari A, Takeuchi K, Suzuki S, et al. *Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in nasal polyps*. Acta Otolaryngol. 2004;124(10):1165-1170
29. Can IH, Ceylan K, Caydere M, Samim EE, Ustun H, Karasoy DS. *The expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis*. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008 Aug;139(2):211-5
30. Chen YS, Langhammer T, Westhofen M, Lorenzen J. *Relationship between matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 and IL-5, IL-8 in nasal polyps*. Allergy. 2007;62:66-72
31. Eisenberg G, Pradillo J, Plaza G, Lizasoain I, Moro MA. *Increased expression and activity of MMP-9 in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. Acta Otorrinolaringol Esp. 2008;59(9):444-7
32. Lechapt-Zalcman E, Coste A, d'Ortho MP, Frisdal E, Harf A, Lafuma C, et al. *Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps*. J Pathol. 2001;193:233-41
33. Shin HW, Han DH, Lim YS, Kim HJ, Kim DY, Lee CH, Min YG, Rhee CS. *Non asthmatic nasal polyposis patients with allergy exhibit greater epithelial MMP positivity*. Otolaryngol Head Neck Surg 2009;141:442-447

34. Watelet JB, Bachert C, Claeys C, Van Cauwenberge P. *Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polypsis.* Allergy 2004;59:54-60
35. Can IH, Ceylan K, Caydere M, Samim EE, Ustun H, Karasoy DS. *The expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 in chronic rhinosinusitis and nasal polypsis.* Otolaryngol Head Neck Surg. 2008 Aug;139(2):211-5
36. Kostamo K, Tervahartiala T, Sorsa T, Richardson M, Toskala E. *Metalloproteinase function in chronic rhinosinusitis with nasal polypsis.* Laryngoscope. 2007 Apr;117(4):638-43
37. Wang LF, Chien CY, Kuo WR, Tai CF, Hank Juo SH. *Matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in nasal polyps.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;134(8):852-856
38. Kahveci OK, Derekoy FS, Yilmaz MD, Serteser M, Altuntas A. *The role of MMP-1 and TIMP-1 in nasal polyp formation.* Swiss Med Wkly 2008;138(45-46):684-688
39. Mudd PA, Katial RK, Alam R, Hohensee S, Ramakrishnan V, Kingdom TT. *Variations in expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in nasal mucosa of aspirin-sensitive versus aspirin-tolerant patients with nasal polypsis.* Ann Allergy Asthma Immunol. 2011 Oct;107(4):353-9
40. Evibilen A, Cayli S, Aladag I, Koç S, Gurbuzler L, Atay GA. *Distribution of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in nasal polypsis and chronic rhinosinusitis.* Histol Histopathol. 2011 May;26(5):615-21